



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**Caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. em amostras
biológicas de humanos e animais provenientes da Roménia:
comparação com as características dos organismos obtidos das
populações humana e animal portuguesa**

Patrícia Manuela da Silva Vieira

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS**

OUTUBRO, 2012



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**Caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. em amostras
biológicas de humanos e animais provenientes da Roménia:
comparação com as características dos organismos obtidos das
populações humana e animal portuguesa**

Mestranda: Patrícia Manuela da Silva Vieira

Orientadora: Professora Doutora Olga Matos

Co-orientadora: Doutora Maria Luísa Lobo

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

OUTUBRO, 2012

O presente trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Olga Matos e co-orientação da Doutora Maria Luisa Lobo do Grupo dos Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, da Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Dedico este trabalho ao Homem da minha vida, o meu pai (in memoriam) que me ensinou tudo o que vale a pena na vida, à minha mãe e irmã que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, e a ti Carlos, pela enorme paciência e dedicação nestes anos.

AGRADECIMENTOS

Nesta importante etapa final do meu percurso académico, quero desde já expressar a minha sincera gratidão e reconhecimento à Professora Doutora Olga Matos. Os conhecimentos e as críticas construtivas transmitidas ao longo do ano foram imprescindíveis para a concretização deste projecto, mas também o seu incentivo, entusiasmo, rigor científico e disponibilidade no esclarecimento de dúvidas durante a orientação científica da presente dissertação revelaram-se fundamentais para alcançar com sucesso esta etapa da minha vida.

Agradeço à Doutora Maria Luísa Lobo pela sua boa disposição e amizade expressa que contribuíram para o resultado final deste projecto, mas também pela integração no laboratório do departamento, pelas suas sugestões perante os diversos obstáculos a nível laboratorial e pelo insubstituível apoio prestado.

À Professora Doutora Narcisa Mederle, professora auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária de Timisoara na Roménia agradeço a cedência das amostras biológicas e dos respectivos dados demográficos, clínicos e laboratoriais, sem os quais este projecto não seria possível. *I thank Professor Narcisa Mederle, from Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Timisoara, Romania, for providing biological samples and demographic, clinical and laboratory data of studied subjects, without which this project would not have been possible.*

Ao Doutor Lihua Xiao do *Centers for Disease Control and Prevention* agradeço a disponibilidade manifestada na realização das análises das relações filogenéticas que contribuiu para o enriquecimento da presente dissertação.

Ao Doutor Francisco Esteves e à Mestre Vera Códices agradeço a sua boa disposição, bom humor e constante disponibilidade que possibilitou a minha rápida integração na equipa.

À Dra. Camila Fernandes e à Dra. Carina Máximo agradeço o incontornável companheirismo e amizade manifestada, mas também os bons momentos e as “acesas” discussões que tornaram possíveis muitas e boas gargalhadas.

A todos os meus colegas de trabalho do Hospital Militar Principal agradeço o incansável incentivo e apoio emocional que directa e indirectamente tornou possível, desde logo, a realização deste projecto.

Agradeço a todos os meus amigos o carinho, a compreensão, e a constante atenção e interesse manifestada durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos meus pais e à minha irmã manifesto o meu profundo reconhecimento pela confiança depositada em mim e nas minhas escolhas, e pelo apoio incondicional durante todo o meu percurso académico e profissional.

A todos o meu muito obrigado!

RESUMO

Caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. em amostras biológicas de humanos e animais provenientes da Roménia: comparação com as características dos organismos obtidos das populações humana e animal portuguesa

Patrícia Manuela da Silva Vieira

As espécies de *Cryptosporidium* são parasitas apicomplexa ubíquos e importantes agentes etiológicos de doença gastrointestinal. A infecção por *Cryptosporidium* spp. pode ser adquirida por diversas vias de transmissão, sendo a diarreia o sinal mais frequente de doença. Uma grande variedade de animais e os humanos são infectados, sendo os imunocomprometidos e os jovens os grupos mais susceptíveis à infecção. Os humanos são infectados principalmente por duas espécies, *Cryptosporidium hominis* (transmissão antroponótica) e *Cryptosporidium parvum* (transmissão antroponótica ou zoonótica), enquanto o gado doméstico pode ser infectado por várias espécies de *Cryptosporidium*. Nos últimos anos, as ferramentas moleculares têm permitido aprofundar o conhecimento acerca da epidemiologia destes parasitas. O elevado polimorfismo apresentado por alguns *loci* têm permitido caracterizar a diversidade genética ao nível do subtipo, conduzindo a uma melhor compreensão das fontes de infecção e dinâmicas de transmissão em humanos e animais. Com este trabalho pretendemos caracterizar geneticamente as espécies de *Cryptosporidium* de origem humana e animal provenientes da Roménia através da técnica de *nested*-PCR aplicada a dois *loci*, a subunidade pequena do ácido ribonucleico ribossómico e a glicoproteína de 60-kDa, com a finalidade de compreender os principais reservatórios presentes neste país. No presente estudo, a frequência geral de infecção em crianças foi 36,4% (4/11), em vitelos foi 62,1% (18/29), e em porcos 25% (2/8). A análise das sequências revelou que todos os isolados são *Cryptosporidium parvum*. Duas famílias de subtipo foram identificadas, IIa e IId. O subtipo IIdA22G1 de *C. parvum* foi o único caracterizado nas crianças (n=4). Em vitelos foram identificados os subtipos IIdA27G1 (n=8), IIdA25G1 (n=5), IIdA22G1 (n=2), IIdA21G1a (n=1) e IIaA16G1R1 (n=1), enquanto nos suínos apenas foi identificado o subtipo IIdA26G1 (n=1). Estes resultados mostram uma perspectiva epidemiológica muito diferente dos estudos romenos anteriores, uma vez que os cinco subtipos da família IId identificados neste estudo nunca foram identificados anteriormente no país, mostrando que a dinâmica de transmissão na Roménia é mais complexa do que as conclusões anteriores. Por sua vez, em Portugal parece existir uma maior diversidade genética de isolados de *Cryptosporidium* spp. Até à data foram identificadas quatro famílias de subtipo de *C. parvum*, IIa, IIb, IIc e IId, verificando-se que o subtipo IIaA15G2R1 foi o mais frequente em ambas as populações. Além deste foram identificados quatro subtipos na família IId, dois dos quais são comuns ao nosso estudo, nomeadamente IIdA21G1 e IIdA22G1. A comparação entre os nossos resultados e aqueles encontrados em Portugal revela que apesar de existirem algumas diferenças relativamente à dinâmica de transmissão na população humana de Portugal e do distrito de Timis da Roménia, no geral, os reservatórios e os modos de transmissão em ambos os países são bastante semelhantes.

Palavras-chave: Epidemiologia, *Cryptosporidium parvum*, crianças, vitelos, GP60, subtipos.

ABSTRACT

Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. in biological samples from humans and animals from Romania: comparison with the characteristics of the organisms obtained from humans and animals in Portugal

Patrícia Manuela da Silva Vieira

Cryptosporidium species are ubiquitous apicomplexan parasites and important etiological agents of gastrointestinal disease. *Cryptosporidium* infection has several transmission routes, being diarrhea the most frequent sign of disease. A wide range of animals and humans are infected, being immunocompromised individuals and the youngsters the groups more susceptible to infection. Humans are mainly infected by two species, *Cryptosporidium hominis* (anthroponotic transmission) and *Cryptosporidium parvum* (zoonotic or anthroponotic transmission), whereas cattle can be infected by several species of *Cryptosporidium*. In recent years, molecular tools have improved the knowledge about the epidemiology of these parasites. Some loci have revealed high degree of polymorphisms allowing characterize genetic diversity at subtype level, leading to a better understanding of sources of infection and transmission dynamics in humans and animals. With this work we intend to genetically characterize *Cryptosporidium* spp. organisms of human and animal origin, from Romania, using nested-PCR techniques applied to two loci, small subunit ribosomal ribonucleic acid and 60-kDa glycoprotein, with the purpose to understand the main reservoirs present in this country. In the present study, the overall frequency of infection in children was 36.4% (4/11), in calves was 62.1% (18/29), and in pigs was 25% (2/8). Sequence analyses revealed that all isolates were *Cryptosporidium parvum*. Two subtype families were identified, IIa and IId. Subtype IIdA22G1 (n=4) was the single *C. parvum* subtype characterized in children. The subtypes identified in calves were IIdA27G1 (n=8), IIdA25G1 (n=5), IIdA22G1 (n=2), IIdA21G1a (n=1) and IIaA16G1R1 (n=1), and in pigs, the IIdA26G1 subtype (n=1) was the only one observed. These results show a remarkable different epidemiologic perspective from previous Romanian reports, since the five subtypes of family IId identified in this study have never been identified previously in this country, showing that transmission dynamics in Romania is more complex than previous conclusions. Meanwhile, in Portugal there seems to be a greater genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in both animal and human populations. To date four *C. parvum* subtype families were identified, IIa, IIb, IIc and IId, verifying that IIaA15G2R1 subtype was the most frequent in humans and bovine populations. In addition to this, four subtypes have been identified in the IId subtype family, two of which are common to our study, including IIdA21G1 and IIdA22G1. The comparison of our results obtained with the Romanian populations studied and those found in Portugal show that although there are some differences regarding the transmission dynamics of the human populations of Portugal and the Timis county of Romania, in general, the reservoirs and modes of transmission in both countries are very similar.

Keywords: Epidemiology, *Cryptosporidium parvum*, children, calves, GP60, subtypes.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Classificação taxonómica.....	2
1.1.1. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> descritas no Homem	5
1.2. Ciclo de vida e morfologia.....	9
1.3. Reservatórios e vias de transmissão	14
1.3.1. Transmissão zoonótica	14
1.3.2. Transmissão antroponótica.....	16
1.3.3. Transmissão hídrica.....	17
1.3.4. Transmissão alimentar.....	19
1.3.5. Transmissão mecânica por vectores	19
1.4. Criptosporidiose	20
1.4.1. Prevalência de infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. no Homem	20
1.4.2. Prevalência de infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. no gado doméstico.....	21
1.4.3. Fisiopatologia da diarreia causada pela infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp.	23
1.4.4. Manifestações clínicas nos humanos e nos animais	24
1.5. Diagnóstico microscópico e molecular	27
1.6. Abordagem terapêutica e profiláctica	29
1.7. Epidemiologia molecular	31
1.7.1. Caracterização molecular	31
1.7.1.1. <i>Locus</i> SSU rRNA.....	32
1.7.1.2. <i>Locus</i> GP60.....	33
1.7.2. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> prevalentes no Homem.....	37
1.7.3. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> prevalentes no gado doméstico.....	39
1.7.4. Famílias de subtipo e subtipos de <i>C. parvum</i> e de <i>C. hominis</i>	41

Objectivos	45
MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1. População do estudo.....	47
2.1.1. População humana.....	47
2.1.2. População animal.....	47
2.2. Diagnóstico parasitológico.....	48
2.2.1. Preparação do esfregaço fecal directo	48
2.2.2. Concentração das amostras fecais	48
2.2.3. Coloração de Ziehl-Neelsen modificada	49
2.2.4. Observação microscópica	50
2.3. Extracção de DNA genómico dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	51
2.3.1. Preparação dos oocistos para extracção de DNA	51
2.3.2. Método Mini-BeadBeater/Sílica.....	51
2.4. Diagnóstico e caracterização dos isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp. por métodos moleculares.....	53
2.4.1. <i>Locus</i> SSU rRNA	53
2.4.1.1. Amplificação do <i>locus</i> SSU rRNA por <i>nested</i> -PCR.....	54
2.4.1.2. Visualização dos produtos de PCR do gene SSU rRNA	56
2.4.2. <i>Locus</i> GP60	57
2.4.2.1. Amplificação do <i>locus</i> GP60 por <i>nested</i> -PCR.....	57
2.4.2.2. Visualização dos produtos de PCR do gene GP60	59
2.5. Purificação dos produtos de PCR.....	60
2.6. Bioinformática: análise da diversidade genética por sequenciação	61
RESULTADOS	63
3.1. Diagnóstico parasitológico.....	64

3.2. Diagnóstico e caracterização dos isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp. por métodos moleculares.....	67
3.2.1. <i>Locus</i> SSU rRNA	67
3.2.1.1. Diagnóstico molecular com o gene SSU rRNA.....	67
3.2.1.2. Caracterização molecular dos isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp.	69
3.2.2. <i>Locus</i> GP60	70
3.2.2.1. Diagnóstico molecular com o gene GP60.....	70
3.2.2.2. Caracterização intra-molecular de <i>C. parvum</i>	71
3.2.2.3. Distribuição e prevalência das famílias de subtipo e subtipos de <i>C. parvum</i>	80
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	85
4.1. Considerações gerais	86
4.2. Frequência de infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. nas populações humana e animal	87
4.3. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> nas populações humana e animal	92
4.4. Subtipos de <i>C. parvum</i> nas populações humana e animal	99
4.5. Constituição genética da população de <i>Cryptosporidium</i> spp. nos humanos e animais: Portugal vs Roménia	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ÍNDICE DE FIGURAS	134
ÍNDICE DE QUADROS	136
ANEXOS.....	138

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
% v/v	Porcentagem volume/volume
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
A	Adenina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino, em inglês <i>bovine serum albumine</i>
C	Citosina
Cél/mm ³	Células por milímetro cúbico
Cl ⁻	Cloro
COWP	Proteína da parede do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> , do inglês <i>Cryptosporidium oocyst wall protein</i>
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	“E outros”, da locução latina <i>et alii</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

<i>g</i>	Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
G	Guanina
GP15	Glicoproteína de 15-kDa
GP45	Glicoproteína de 45-kDa
GP45	Glicoproteína de 40-kDa
GP60	Glicoproteína de 60-kDa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H ₂ O	Água
HAART	Terapêutica anti-retroviral altamente activa, do inglês <i>highly active antiretroviral therapy</i>
HCl	Ácido clorídrico
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HSP70	Proteína de choque térmico de 70-kDa, do inglês <i>heat shock protein 70-kDa</i>
IgG	Imunoglobulina G
ITS1	Espaçador de transcrição interna 1, do inglês <i>internal transcribed spacer 1</i>
ITS2	Espaçador de transcrição interna 2, do inglês <i>internal transcribed spacer 2</i>
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
LSU rRNA	Subunidade grande do ácido ribonucleico ribossômico, do inglês <i>large subunit ribosomal ribonucleic acid</i>
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mg	Miligrama

ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MultAlin	<i>Multiple sequence alignment by Florence Corpet</i>
n	Número de indivíduos
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaClO ₄	Perclorato de sódio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amónio
pb	Par de bases
PCR	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução (-log [H ⁺])
pmol	Picomole
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossómico, do inglês <i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossómico, do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
SAAP	Polimorfismo de aminoácido único, do inglês <i>single amino acid polymorphism</i>
Sida	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNP	Polimorfismo de base única, do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
spp.	Espécies
SSU rRNA	Subunidade pequena do ácido ribonucleico ribossómico, do inglês <i>small subunit ribosomal ribonucleic acid</i>
v	Volume
V	Volts

VIH	Vírus da imunodeficiência humano
T	Timina
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TRAP-C1	Proteína de adesão relacionada com a trombospondina de <i>Cryptosporidium</i> -1, do inglês <i>thrombospondin-related adhesive protein of Cryptosporidium</i> -1
TRAP-C2	Proteína de adesão relacionada com a trombospondina de <i>Cryptosporidium</i> -2 do inglês <i>thrombospondin-related adhesive protein of Cryptosporidium</i> -2
Tris	Tris(hidroximetilo)aminometano
U	Unidade
UV	Ultra violeta

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Classificação taxonómica

O género *Cryptosporidium* foi proposto em 1910 por Ernest Edward Tyzzer (Tyzzer, 1910) após descrição detalhada de um protozoário observado inicialmente, em 1907, nas glândulas gástricas de ratos, o qual foi designado *Cryptosporidium muris* (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2004; Xiao *et al.* 2004). Posteriormente, em 1912, descreve uma outra espécie cujos oocistos eram significativamente menores, comparativamente à primeira espécie descrita, e o local de infecção não era o estômago mas o intestino delgado, tendo sido designada por *Cryptosporidium parvum* (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2004; Xiao *et al.* 2004; Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2010). Contudo, os primeiros relatos de criptosporidiose animal surgiram apenas em 1971, enquanto no Homem só em 1976 foram reconhecidos os efeitos patogénicos do agente da criptosporidiose (Fayer & Ungar 1986; Fayer, 2004; Smith & Nichols, 2007). No entanto, o interesse pelo género *Cryptosporidium* surge somente em 1982 aquando da divulgação de um estudo onde a criptosporidiose foi descrita em 21 doentes do sexo masculino portadores da Síndrome da imunodeficiência adquirida (Sida) (Fayer, 2004).

Ao longo de vários anos foram descritas várias espécies novas, algumas das quais foram invalidadas uma vez que os oocistos descritos revelaram ser esporocistos de espécies *Sarcocystis* (Fayer & Ungar 1986; Xiao *et al.* 2004; Xiao & Cama, 2006). Numa fase posterior, as subseqüentes espécies eram designadas tradicionalmente de acordo com o hospedeiro que parasitavam, conduzindo à descrição de múltiplas espécies novas (Xiao *et al.* 2000a; 2004; Xiao & Cama, 2006; Fayer, 2010). Contudo, estudos posteriores de transmissão cruzada demonstraram que as espécies de *Cryptosporidium* não são estritamente específicas para um determinado hospedeiro (Fayer & Ungar, 1986; Xiao *et al.* 2000a, 2004; Egyed *et al.* 2003; Xiao & Cama, 2006) e, conseqüentemente as espécies até então descritas em todos os mamíferos, incluindo o Homem, foram genericamente designadas por *C. parvum* (Xiao *et al.* 2004; Xiao & Cama, 2006). A análise morfométrica dos oocistos, por si só, também não permite a distinção eficaz das várias espécies que compõem o género uma vez que quer o tamanho quer a morfologia são extremamente idênticas entre as várias espécies do género (Xiao *et al.* 2004; Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010).

Até há relativamente pouco tempo os critérios utilizados para diferenciar as espécies do género *Cryptosporidium* diziam respeito aos dados morfométricos do oocisto e à especificidade e local de infecção no hospedeiro (Leav *et al.* 2003; Monis & Thompson, 2003; Smith & Nichols, 2007). Recentemente a utilização de marcadores moleculares em conjunto com os parâmetros já referidos, para além de permitirem uma melhor clarificação taxonómica destes protozoários têm permitido a validação de várias espécies e a identificação de vários genótipos nas diferentes classes de vertebrados (Xiao *et al.* 2000a, 2004; Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007). Actualmente é reconhecida a carência de dados consistentes relativos à classificação dos protozoários em geral, particularmente no que refere à taxonomia do género *Cryptosporidium* (Xiao *et al.* 2000a, 2004; Plutzer & Karanis, 2009), a qual revela-se ainda confusa, insuficiente e de enorme complexidade (Monis & Thompson, 2003; Xiao *et al.* 2004), o que justifica a contínua revisão, a cada nova informação adquirida, relativa à genética, bioquímica ou biologia destes protozoários (Fayer, 2004; Plutzer & Karanis, 2009).

Os protozoários do género *Cryptosporidium* compreendem organismos eucariotas unicelulares (Fayer *et al.* 2000; Fayer, 2008) e foram originalmente classificados como coccídeos devido às características similares ao nível do ciclo de vida (Hijjawi *et al.* 2002; Rosales *et al.* 2005). A taxonomia vigente coloca-os no filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, e família Cryptosporidiidae uma vez que os oocistos contêm no seu interior quatro esporozoítos não rodeados por esporocistos (Fayer & Ungar, 1986; Current & Garcia, 1991; O'Donoghue, 1995; Egyed *et al.* 2003; Smith & Nichols, 2007; Plutzer & Karanis, 2009). Contudo, a actual classificação taxonómica destes protozoários é questionada por vários autores, nomeadamente por Carreno *et al.* (1999). Estes autores partindo de estudos moleculares demonstraram através da análise do gene da subunidade pequena do ácido ribonucleico ribossómico (SSU rRNA, do inglês *small subunit ribosomal RNA*) que as espécies do género *Cryptosporidium* apresentam uma relação mais próxima com os protozoários gregarinas comparativamente aos protozoários coccídeos (Carreno *et al.* 1999). Adicionalmente Hijjawi *et al.* (2002) e Rosales *et al.* (2005) reforçam o actual paradigma taxonómico (figura 1) ao demonstrarem respectivamente em duas espécies, *Cryptosporidium andersoni* e *C. parvum* estádios do ciclo de vida semelhantes aos protozoários gregarinas. Além destas

evidências, as espécies de *Cryptosporidium* são consideradas atípicas devido à presença de características muito peculiares que as tornam únicas entre coccídeos, nomeadamente a produção de dois tipos de oocistos morfologicamente distintos, alguns dos quais com capacidade auto-infecciosa, o local que ocupam no interior da célula hospedeira, a presença de um organelo alimentador (em inglês *feeder organelle*), e a resistência aos fármacos antiparasitários (Hijjawi *et al.* 2002; Rosales *et al.* 2005; Plutzer & Karanis, 2009).

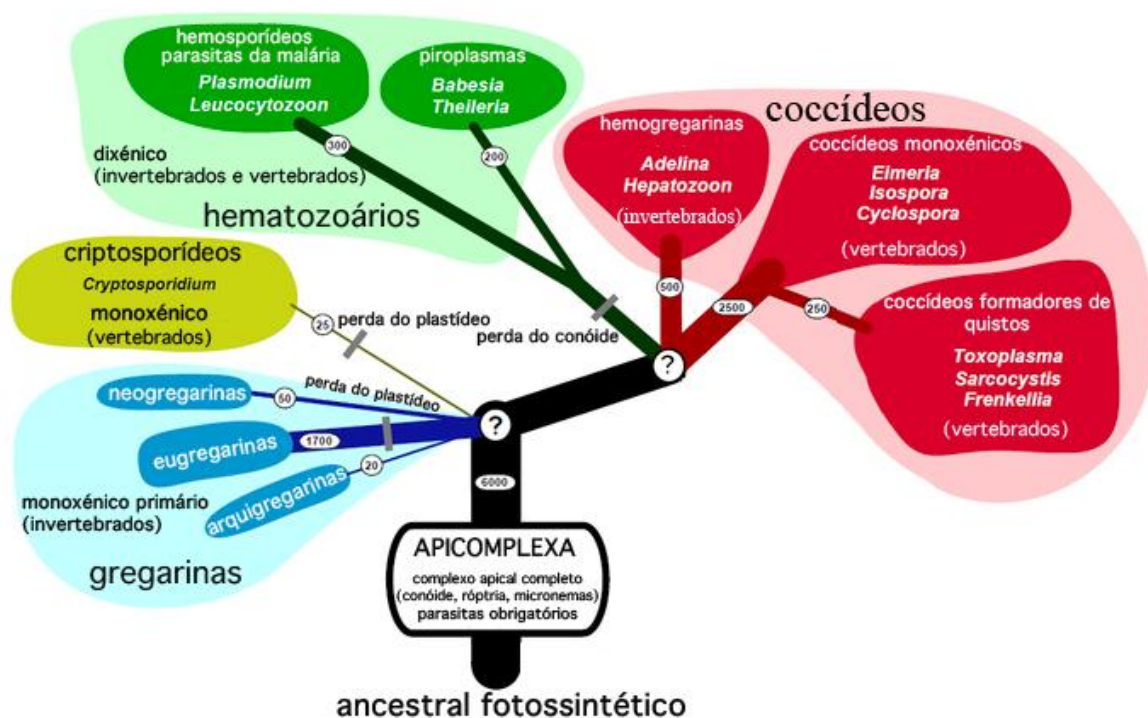


Figura 1. Representação esquemática do actual paradigma taxonómico do género *Cryptosporidium*. Os principais grupos parasitários do filo Apicomplexa e respectivos ciclos de vida encontram-se destacados a vermelho, verde e azul. O género *Cryptosporidium* constitui um grupo independente e que parece ter emergido a partir de um ancestral comum aos protozoários gregarinas. Os números representados nas ramificações e espessura dos mesmos indicam a diversidade ao nível da espécie (adaptado e modificado de <http://tolweb.org/Apicomplexa>, consultado a 12/04/2012).

O género *Cryptosporidium* é actualmente constituído por várias espécies, e embora o seu número exacto ainda não esteja definido, variando consoante o autor (Egyed *et al.* 2003), as espécies mais bem caracterizadas compreendem *Cryptosporidium hominis* encontrado nos humanos, *C. parvum* descrito nos humanos e ruminantes, *C. andersoni*, *Cryptosporidium bovis* e *Cryptosporidium ryanae* nos bovinos, *Cryptosporidium canis* em cães, *Cryptosporidium muris* em roedores e outros

mamíferos, *Cryptosporidium felis* em gatos, *Cryptosporidium suis* em porcos, *Cryptosporidium wrairi* em porcos-da-índia, *Cryptosporidium meleagridis* em perús e humanos, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli* em galinhas e outras aves, *Cryptosporidium varanii* em lagartos, *Cryptosporidium serpentis* em cobras e lagartos, *Cryptosporidium molnari* e *Cryptosporidium scophthalmi* em peixes (Xiao *et al.* 2004; Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2010). Estudos filogenéticos com base nas sequências dos genes que codificam a SSU rRNA, a proteína de choque térmico de 70-kDa (HSP70, do inglês *heat shock protein* 70-kDa) e a proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP, do inglês *Cryptosporidium* oocyst wall protein) dividem o gênero em dois grupos, as espécies gástricas, do qual fazem parte *C. muris*, *C. serpentis*, *C. galli* e *C. andersoni*, e as espécies intestinais, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. saurophilum*, *C. baileyi* e *C. suis* (Xiao *et al.* 1999a, 1999b, 2000a; 2004; Egyed *et al.* 2003).

1.1.1. Espécies de *Cryptosporidium* descritas no Homem

Para além de *C. hominis* e *C. parvum*, outras cinco espécies já foram descritas no Homem, nomeadamente *C. muris*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. suis* (quadro I) (Pieniazek *et al.* 1999; McLauchlin *et al.* 2000; Morgan *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2001; Xiao *et al.* 2001a; Alves *et al.* 2001, 2003, 2006; Gatei *et al.* 2003; Palmer *et al.* 2003; Matos *et al.* 2004; Leoni *et al.* 2006; Cama *et al.* 2007).

C. muris, descrito em 1907 por Ernest Edward Tyzzer (Tyzzer, 1907), compreende um protozoário frequentemente observado nas glândulas gástricas do rato (*Mus musculus*) (Morgan *et al.* 1999; Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010). Os oocistos desta espécie medem cerca de 6,1 x 8,4 µm (Palmer *et al.* 2003; Plutzer & Karanis, 2009) tendo sido demonstrado a transmissão destas estruturas via fecal-oral (Xiao *et al.* 2004). Estudos posteriores evidenciaram a capacidade de *C. muris* parasitar uma grande variedade de hospedeiros, tais como hamsters, esquilos, cabras da montanha, camelos e humanos (Morgan *et al.* 1999; Guyot *et al.* 2001; Gatei *et al.* 2003; Palmer *et al.* 2003; Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010).

C. parvum, referido também como genótipo bovino ou genótipo II, foi descrito em 1912 por Tyzzer (Tyzzer, 1912) e, compreende a espécie descrita mais

frequentemente nos mamíferos (Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010). Inicialmente descrito no rato (*Mus musculus*), *C. parvum* apresenta algumas características distintas de *C. muris*, nomeadamente o intestino delgado como local de infecção, e o tamanho mais reduzido dos oocistos, 5,0 x 4,5 µm (Upton & Current, 1985; Xiao *et al.* 2004). Os seus principais hospedeiros compreendem os ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) e os humanos, podendo também parasitar cavalos, cães, animais selvagens e ruminantes do zoo (Alves *et al.* 2003, 2006; Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010).

C. hominis referido anteriormente por *C. parvum* genótipo humano, genótipo I ou genótipo H (Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010) infecta principalmente os humanos e foi descrito por Morgan-Ryan *et al.* (2002) como uma espécie distinta de *C. parvum* com base nas características genéticas, e biológicas, nomeadamente a infecciosidade e patogenicidade. Os oocistos desta espécie são morfológicamente semelhantes aos de *C. parvum* e medem em média 5,2 x 4,86 µm (Morgan-Ryan *et al.* 2002). *C. hominis* infecta quase exclusivamente os humanos e, contrariamente a *C. parvum*, em condições experimentais, os oocistos de *C. hominis* revelaram-se não infecciosos para ratos, gatos, cães e bovinos, contudo revelaram-se infecciosos para cordeiros, vitelos e leitões (Morgan-Ryan *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010). Na natureza esta espécie já foi descrita em caprinos, ovinos, bovinos e num dugongo (Morgan-Ryan *et al.* 2002; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010). Para além das características distintas a nível biológico, estudos genéticos posteriores em vários *loci* revelam diferenças significativas entre ambas as espécies (Xiao *et al.* 2004), assim como na expressão de genes ribossomais: enquanto *C. parvum* expressa dois tipos de genes de ácido ribonucleico ribossómico (rRNA, do inglês *ribosomal ribonucleic acid*), tipo A e tipo B (Le Blancq *et al.* 1997), já foram identificados mais de dois transcritos em *C. hominis* (Morgan-Ryan *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009). As diferenças a nível biológico e genético, para além de demonstrarem as particularidades de *C. parvum* e de *C. hominis*, suportam a sua existência enquanto espécies distintas (Morgan-Ryan *et al.* 2002).

C. canis, originalmente designado por *C. parvum* genótipo cão foi considerado uma nova espécie após estudos de transmissão e análise dos *loci* SSU rRNA e HSP70 por Fayer *et al.* (2001). Esta espécie tem sido descrita nas fezes de cães (*Canis*

familiaris) a nível mundial (Fayer *et al.* 2001; Xiao *et al.* 2004) e os seus oocistos, morfologicamente indistinguíveis dos de *C. parvum*, medem 4,95 x 4,71 µm (Fayer *et al.* 2001). Para além dos cães, *C. canis* pode ainda causar infecção em coiotes, raposas e nos humanos (Xiao *et al.* 2001a, 2004; Leoni *et al.* 2006; Cama *et al.* 2007; Fayer, 2010). *C. felis* foi inicialmente descrito por Iseki em 1979 (Iseki, 1979) a partir das características dos oocistos e aspectos biológicos relativos à especificidade do hospedeiro, estádios endógenos e patogenicidade em gatos (*Felis catus*) (Xiao *et al.* 2004; Fayer, 2010). Análises moleculares posteriores em vários *loci* permitiram distinguir *C. felis* eficazmente de *C. parvum* e validá-lo enquanto espécie (Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010). Os oocistos medem cerca de 5,0 x 4,5 µm (Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009) e embora infecciosos para os humanos (Pieniazek *et al.* 1999; Morgan *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2001; Alves *et al.* 2001, 2003; Xiao *et al.* 2001a, 2004; Matos *et al.* 2004; Leoni *et al.* 2006; Cama *et al.* 2007; Fayer, 2010), estes não infectam ratos, porcos-da-índia ou cães (Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010).

Cryptosporidium meleagridis, embora observado já em 1929 por Tyzzer, só em 1955 é enunciado por Slavin (Slavin, 1955) após descrição de uma espécie muito semelhante em perús (*Meleagris gallopavo*) (Morgan *et al.* 1999; Ryan, 2010). Os oocistos desta espécie medem 4,93 x 4,40 µm e são morfologicamente idênticos aos de *C. parvum* (Xiao *et al.* 2004). Actualmente considerado um agente patogénico humano emergente (Ryan, 2010) *C. meleagridis* é a terceira espécie mais frequente em humanos (Xiao *et al.* 2004; Leoni *et al.* 2006; Cama *et al.* 2007; Fayer, 2010; Ryan, 2010), o que levou alguns autores a sugerir que *C. meleagridis* e *C. parvum* poderiam ser a mesma espécie, hipótese esta não corroborada por estudos moleculares e biológicos, os quais demonstraram características únicas, a nível genético e biológico, da espécie *C. meleagridis* (Xiao *et al.* 2004; Ryan, 2010). Contudo, o termo *C. meleagridis* parece não ser o mais correcto uma vez que para além dos perús, infecta outros hospedeiros aviários (Xiao *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Ryan, 2010) e, à semelhança de *C. parvum*, apresenta uma ampla gama de hospedeiros (Ryan, 2010) tendo sido também descrito em cães e humanos (McLauchlin *et al.* 2000; Morgan *et al.* 2000; Xiao *et al.* 2001a; Guyot *et al.* 2001; Alves *et al.* 2001, 2003; Gatei *et al.* 2003; Hajdušek *et al.* 2004; Matos *et al.* 2004; Leoni *et al.* 2006; Cama *et al.* 2007; Plutzer & Karanis, 2009).

A taxa de infecciosidade e virulência desta espécie nos mamíferos é similar à de *C. parvum*, e inclusive, estudos filogenéticos sugerem que *C. meleagridis* foi originalmente um parasita dos mamíferos que se adaptou a aves através da ingestão de presas infectadas (Ryan, 2010).

C. suis, anteriormente denominado por *C. parvum* genótipo porco I ao ser descrito no porco (*Sus scrofa*) foi descrito enquanto espécie válida por Ryan *et al.* (2004) devido a estudos moleculares em vários *loci* que lhe conferem características únicas e distintas. Os oocistos de *C. suis*, morfologicamente semelhantes aos de *C. parvum*, medem 4,6 x 4,2 µm e são fracamente infecciosos para os bovinos (Ryan *et al.* 2004; Plutzer & Karanis, 2009; Fayer, 2010). O hospedeiro *major* compreende o porco, contudo já foi diagnosticado em vitelos e humanos (Ryan *et al.* 2004; Fayer *et al.* 2006; Leoni *et al.* 2006; Cama *et al.* 2007; Geurden *et al.* 2007; Plutzer & Karanis, 2009).

Quadro I. Características biológicas das espécies do género *Cryptosporidium* descritas nos humanos

Espécie	Oocisto (µm)	Local de infecção	Hospedeiros		Referência
			Major	Minor	
<i>C. muris</i>	6,1 x 8,4	Estômago	Roedor, Camelo	Homem, Cabra da montanha	Palmer <i>et al.</i> 2003; Xiao <i>et al.</i> 2004
<i>C. parvum</i>	5,0 x 4,5	Intestino delgado	Bovino, Ovino, Caprino, Veado, Homem	Porco, Cavalo, Rato	Upton & Current, 1985; Xiao <i>et al.</i> 2004
<i>C. hominis</i>	5,2 x 4,86	Intestino delgado	Homem	Ovino, Dugongo	Morgan-Ryan <i>et al.</i> 2002
<i>C. canis</i>	4,95 x 4,71	Intestino delgado	Cão	Homem	Fayer <i>et al.</i> 2001
<i>C. felis</i>	5,0 x 4,5	Intestino delgado	Gato	Homem, Bovino	Iseki, 1979; Xiao <i>et al.</i> 2004
<i>C. meleagridis</i>	4,93 x 4,40	Intestino delgado	Perú, Homem	Papagaio	Slavin, 1955; Xiao <i>et al.</i> 2004
<i>C. suis</i>	4,6 x 4,2	Intestino delgado e Intestino grosso	Porco	Homem	Ryan <i>et al.</i> 2004

1.2. Ciclo de vida e morfologia

Os protozoários do género *Cryptosporidium* são parasitas intracelulares obrigatórios (Current & Garcia, 1991; Fayer *et al.* 2000; Fayer, 2004; Smith *et al.* 2005; Smith & Nichols, 2007) com um ciclo de vida monoxénico (O'Donoghue, 1995; Egyed *et al.* 2003; Carey *et al.* 2004; Smith *et al.* 2005; Smith & Nichols, 2007) e bastante complexo (Carey *et al.* 2004; Sunnotel *et al.* 2006). Os oocistos esporulados, o único estágio exógeno documentado (Fayer, 2004, 2008), são inicialmente excretados nas fezes por um hospedeiro infectado e ingeridos por um hospedeiro susceptível (figura 2) (Fayer & Ungar, 1986; Fayer *et al.* 2000; Tzipori & Ward, 2002; Fayer, 2008; O'Hara & Chen, 2011). Uma vez ingeridos, os oocistos desenquistam no tracto gastrointestinal por acção dos sais biliares e enzimas pancreáticas bem como devido a mudanças na temperatura e pH, permitindo a libertação de quatro esporozoítos móveis através da dissolução de uma fissura localizada numa das extremidades da parede do oocisto (O'Donoghue, 1995; Carey *et al.* 2004; Smith *et al.* 2005; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2008; O'Hara & Chen, 2011). As subsequentes etapas de ligação, mobilidade e invasão por parte dos estádios invasivos do parasita, são processos complexos que envolvem múltiplos ligandos deste e receptores do hospedeiro (Tzipori & Ward, 2002). Durante o processo de invasão, os esporozoítos são envolvidos pela membrana apical do enterócito, que se estende sobre a extremidade apical do parasita, ocorrendo a fusão de ambas as membranas para formar o vacúolo parasitóforo (Smith *et al.* 2005; Fayer, 2008; O'Hara & Chen, 2011). Os esporozoítos contidos nestas estruturas são intracelulares, mas ocupam uma posição extracitoplasmática (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2004; Smith *et al.* 2005; Fayer, 2008; Chalmers & Davies, 2010; O'Hara & Chen, 2011). Na base do vacúolo parasitóforo segue-se o desenvolvimento de uma estrutura única, um organelo alimentador, que mais não é do que uma membrana muito invaginada e, através do qual o parasita obtém energia e nutrientes da célula hospedeira (O'Donoghue, 1995; Tzipori & Ward, 2002; Sunnotel *et al.* 2006; Xiao & Cama, 2006; Fayer, 2008; O'Hara & Chen, 2011).

No interior do vacúolo parasitóforo, os esporozoítos adquirem progressivamente uma forma mais esférica diferenciando-se em trofozoítos, os quais dão início ao ciclo reprodutivo assexuado, denominado esquizogonia ou merogonia, e que culmina com a produção de diferentes tipos de merontes (Fayer & Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995;

Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2008; Chalmers & Davies, 2010). Os tipos de merontes variam consoante a espécie (Xiao & Cama, 2006), *C. bailyei* apresenta três tipos de merontes, enquanto *C. parvum* apresenta apenas dois tipos (Current & Garcia, 1991; O'Donoghue, 1995; Fayer, 2008). Relativamente a *C. parvum*, os merontes Tipo I desenvolvem seis a oito núcleos dando origem a merozoítos em igual número (Fayer & Ungar, 1986; Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2008; Chalmers & Davies, 2010). Os merozoítos quando maduros saem do vacúolo parasitóforo e infectam novos enterócitos localizados perto das células infectadas, dando origem a mais merontes Tipo I ou, alternativamente merontes Tipo II. Estes últimos desenvolvem quatro núcleos de forma a produzir quatro merozoítos (Fayer & Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2008; Chalmers & Davies, 2010; O'Hara & Chen, 2011).

O ciclo de reprodução sexuada, também denominado gametogonia, inicia-se somente aquando da formação de merozoítos provenientes dos merontes Tipo II, os quais após infectar novas células diferenciam-se nos estádios sexuais, macro e microgamontes (Fayer & Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Tzipori & Ward, 2002; Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2008; Chalmers & Davies, 2010; O'Hara & Chen, 2011). Os microgamontes tornam-se multinucleados e cada núcleo é incorporado num microgâmeta, que quando libertados aderem e penetram na membrana da célula hospedeira e na membrana do macrogamonte para ocorrer a fertilização (Fayer & Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2008; Chalmers & Davies, 2010; O'Hara & Chen, 2011). O núcleo diplóide do zigoto resultante sofre um processo semelhante à meiose denominado esporogonia, culminando com a formação de oocistos esporulados contendo no seu interior quatro esporozoítos haplóides (O'Donoghue, 1995; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2008; Chalmers & Davies, 2010; O'Hara & Chen, 2011). A esporulação dos oocistos *in situ* permite a sua infecciosidade imediata aos próximos hospedeiros susceptíveis assim que excretados nas fezes (Current & Garcia, 1991; Xiao & Cama, 2006; Chalmers & Davies, 2010) ou, mais raramente nas secreções nasais, caso tenha sido infectado o tracto respiratório (Fayer & Ungar, 1986, Fayer, 2008). Estes oocistos apresentam uma parede espessa, que lhes permitem resistir às condições adversas e pressões do ambiente (Xiao & Cama, 2006; O'Hara & Chen, 2011). No entanto, cerca de 20% dos oocistos produzidos são

constituídos por uma parede fina (Guerrant, 1997; Kosek *et al.* 2001; Xiao & Cama, 2006) e, alternativamente o ciclo de vida pode perpetuar-se no mesmo hospedeiro por um processo de auto-infecção (Fayer & Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Tzipori & Ward, 2002; Xiao & Cama, 2006; Fayer, 2008; Chalmers & Davies, 2010). Os períodos pré-patente (tempo decorrido desde a infecção até à excreção de oocistos) e período patente (tempo que demora a excreção dos oocistos) variam consoante o hospedeiro e as espécies de *Cryptosporidium* envolvidas na infecção (Fayer, 2008; Ramirez *et al.* 2004). O primeiro pode demorar apenas alguns dias ou ir até aproximadamente duas semanas nos animais (Fayer, 2004, 2008) enquanto no Homem, este período varia entre quatro a 22 dias (DuPont *et al.* 1995). O período patente pode demorar apenas alguns dias ou prolongar-se por vários meses (Fayer & Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Fayer, 2004; Ramirez *et al.* 2004).

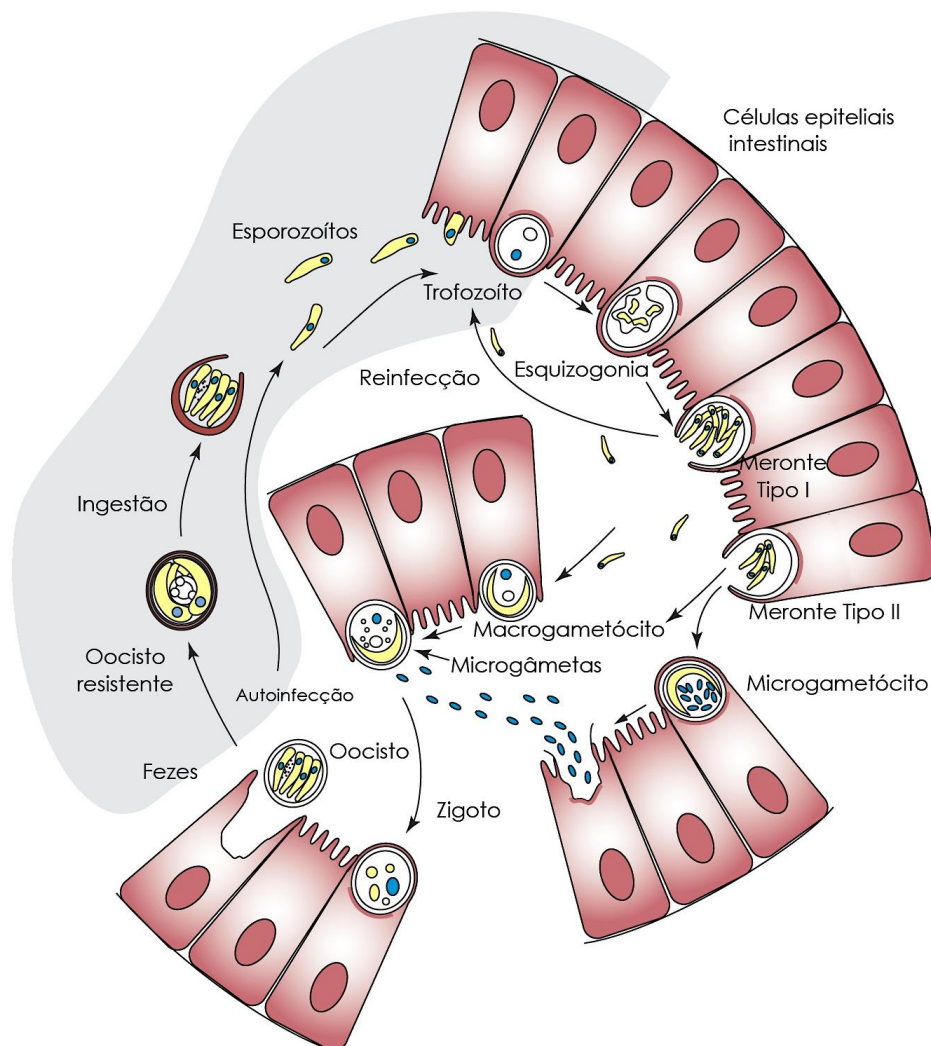


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de *C. parvum* (adaptado e modificado de Smith *et al.* 2005).

O oocisto, a forma de desenvolvimento transmissível das espécies do género *Cryptosporidium* (Smith *et al.* 2005; Smith & Nichols, 2007) apresenta uma forma esférica a oval (Fayer & Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Fayer *et al.* 2000; Ramirez *et al.* 2004; Smith & Nichols, 2007). As suas dimensões variam consoante a espécie, possuindo o oocisto um diâmetro variável entre 3 a 6 μm (Fayer *et al.* 2000; Dillingham *et al.* 2002; Ramirez *et al.* 2004). Internamente, conforme se observa na figura 3(A), o oocisto esporulado é constituído por um corpo residual e quatro esporozoítos (Fayer & Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Smith *et al.* 2005; Fayer, 2008).

Os esporozoítos apresentam uma forma crescente, semelhante a uma vírgula com a extremidade posterior arredondada e a extremidade anterior ligeiramente fina e alongada (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2004, Smith *et al.* 2005; Smith & Nichols, 2007). As suas dimensões variam entre 3,8 a 5,2 x 0,5 a 1,2 μm (Smith *et al.* 2005; Smith & Nichols, 2007; Borowski *et al.* 2010). Dos vários organelos que possuem, como se pode observar na figura 3(B), destacam-se o complexo apical do qual fazem parte os anéis polares apicais, a região conóide e os organelos secretórios necessários à invasão celular (os grânulos densos, os micronemas e uma única rôptria) (Tetley *et al.* 1998; Smith *et al.* 2005; Fayer, 2008), os corpos cristalóides, o retículo endoplasmático (Smith *et al.* 2005; Fayer, 2008), um organelo *plastid-like* (Tetley *et al.* 1998), e o núcleo no terço da extremidade posterior (Fayer & Ungar, 1986; Smith *et al.* 2005).

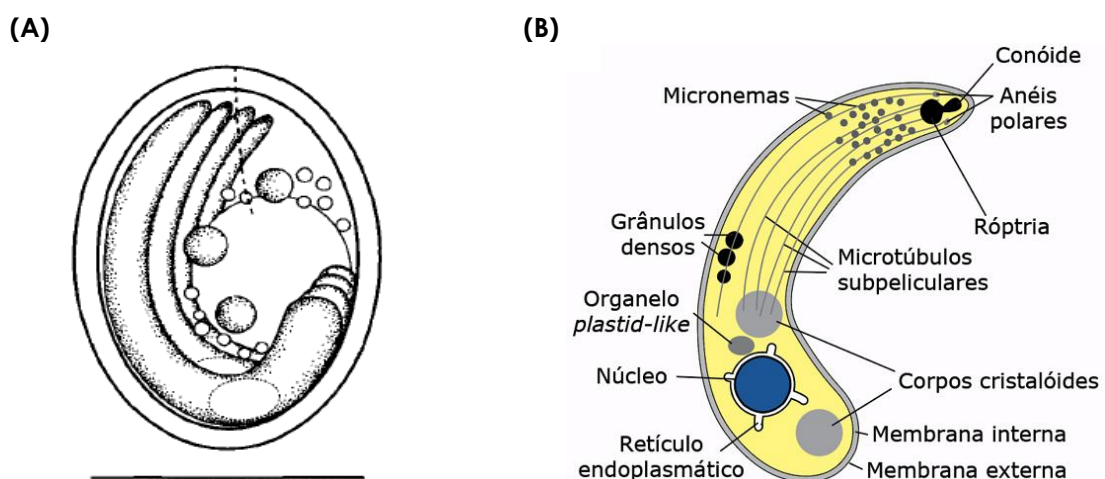


Figura 3. Formas de desenvolvimento de *Cryptosporidium* spp. (A) Representação esquemática do oocisto de *C. andersoni* (adaptado de Lindsay *et al.* 2000), escala 5 μm . (B) Desenho esquemático do esporozoítio de *C. parvum* estilizado (adaptado e modificado de Smith *et al.* 2005).

Os trofozoítos constituem o estágio de transição entre esporozoítos e merozoítos para merontes (Fayer & Ungar, 1986). A sua forma varia entre redonda a oval (Fayer & Ungar, 1986) com um diâmetro compreendido entre 2 a 2,5 μm (Fayer & Ungar, 1986; Borowski *et al.* 2010), e a sua estrutura caracteriza-se essencialmente pela presença de um núcleo com um nucléolo proeminente (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2008). Os merontes, Tipo I e Tipo II são fisicamente distintos, e o seu desenvolvimento no decorrer do ciclo de vida é sequencial (Fayer & Ungar, 1986). Os primeiros apresentam uma superfície lisa e um diâmetro variável entre 1,5 a 2,5 μm , possuindo no seu interior merozoítos com uma forma oval e com dimensões aproximadas de 0,4 x 1 μm . Os merontes tipo II possuem uma membrana lisa e espessa com um diâmetro aproximado de 3,5 μm . Os merozoítos libertados destes merontes são redondos e medem 0,5 a 1 μm de diâmetro (Borowski *et al.* 2010). Os merozoítos, à semelhança dos esporozoítos são móveis e, estruturalmente são constituídos pelo complexo apical localizado na extremidade anterior, e pelo núcleo e retículo endoplasmático, ambos localizados na extremidade posterior (Fayer & Ungar, 1986).

Relativamente às formas de desenvolvimento dos estádios sexuais, o microgamonte apresenta uma forma arredondada (Hijjawi *et al.* 2004; Borowski *et al.* 2010), com um diâmetro aproximado de 5,6 x 5 μm (Hijjawi *et al.* 2004). No seu interior contém 14 a 16 núcleos pequenos e compactos, os quais dão origem aos microgâmetas (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2008). Os macrogamontes são esféricos a ovais (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2008; Borowski *et al.* 2010) e medem entre 4 a 6 μm de diâmetro (Hijjawi *et al.* 2004; Fayer, 2008; Borowski *et al.* 2010). Estruturalmente são constituídos por um núcleo periférico de grandes dimensões (Fayer & Ungar, 1986; Hijjawi *et al.* 2004; Fayer, 2008) com um nucléolo proeminente, grânulos de amilopectina, corpos lipídicos (Fayer, 2008) e um retículo endoplasmático (Fayer & Ungar, 1986).

1.3. Reservatórios e vias de transmissão

À semelhança de outros protozoários entéricos, *Cryptosporidium* spp. apresenta duas vias principais de transmissão fecal-oral (figura 4): a directa que é relativa ao contacto directo com animais (transmissão zoonótica) ou pessoas (transmissão antroponótica) infectadas; e a indirecta em que a infecção resulta do consumo de água e/ou alimentos contaminados (Fayer *et al.* 2000; Dillingham *et al.* 2002; Ramirez *et al.* 2004; Cacciò *et al.* 2005; Xiao & Cama, 2006) ou do transporte mecânico dos oocistos através de vectores (Fayer *et al.* 2000; Dillingham *et al.* 2002; Xiao, 2009). Para além disso, os oocistos apresentam determinantes epidemiológicos singulares que facilitam a sua dispersão e consequente transmissão das várias espécies de *Cryptosporidium* (Kosek *et al.* 2001; Dillingham *et al.* 2002; Cacciò *et al.* 2005). No quadro II encontram-se resumidas as características biológicas dos oocistos responsáveis pelo carácter epidemiológico e transmissão da infecção.

Quadro II. Determinantes epidemiológicos dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e sua importância na dinâmica de transmissão (adaptada e modificada de Dillingham *et al.* 2002)

Características dos oocistos	Importância epidemiológica
Elevada resistência ao cloro	Permite sobreviver à grande maioria dos tratamentos de desinfecção da água para consumo público e fins recreativos
Tamanho bastante reduzido	Dificulta a filtração dos oocistos e requer a utilização de métodos específicos e direccionados para o tratamento eficaz da água
Baixa dose infecciosa	Facilita a aquisição do parasita; Estudos referem que a dose infecciosa média para a espécie <i>C. parvum</i> varia entre 9 a 1042 oocistos*
Excretados plenamente esporulados	Permite a fácil transmissão através do contacto directo entre indivíduos
Potencial zoonótico	Reservatórios animais, os quais são responsáveis pela dispersão dos oocistos no ambiente, contaminação da água e alimentos

*Okhuysen *et al.* 1999

1.3.1. Transmissão zoonótica

O grande interesse pela infecção por *Cryptosporidium* spp. nos humanos surgiu somente no início dos anos 80 (Dillingham *et al.* 2002; Ramirez *et al.* 2004; Hunter & Thompson, 2005; Xiao & Feng, 2008). Até então considerava-se que a criptosporidiose

humana era essencialmente provocada por um protozoário zoonótico (Hunter *et al.* 2003; Hunter & Thompson, 2005), devido à ocorrência de surtos em médicos, estudantes de veterinária e em investigadores que tinham contacto com vitelos infectados, e em crianças que frequentavam feiras e campos agrícolas (Casemore, 1990; Hunter & Thompson, 2005; Feng *et al.* 2007; Xiao & Fayer, 2008; Xiao & Feng, 2008). *C. parvum* ou parasitas *C. parvum-like* já foram descritos em mais de 150 espécies de mamíferos, nomeadamente no gado doméstico, nos animais selvagens e em animais de companhia, o que lhes atribui um importante papel enquanto reservatórios destes parasitas (Fayer *et al.* 2000; Xiao *et al.* 2004; Fayer, 2004; Smith & Nichols, 2007). O principal reservatório de *C. parvum*, a espécie zoonótica mais frequentemente implicada na criptosporidiose humana compreende o gado bovino (Olson *et al.* 2004; Fayer, 2004; Hunter & Thompson, 2005; Xiao & Fayer, 2008; Xiao, 2010), em particular os vitelos mais jovens (Santín *et al.* 2004, 2008; Plutzer & Karanis, 2007; Geurden *et al.* 2007; Xiao & Feng, 2008; Xiao & Fayer, 2008), sendo portanto considerados os reservatórios principais desta espécie (Xiao & Fayer, 2008; Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010). Mais concretamente, a excreção de oocistos por vitelos recém-nascidos infectados é muito elevada, na ordem de 10^7 oocistos por grama de fezes (de Graaf *et al.* 1999), o que os torna responsáveis pelo elevado número de oocistos que contaminam o ambiente (Fayer, 2004). Os animais mais adultos encontram-se maioritariamente infectados por outras espécies não patogénicas para o Homem (Santín *et al.* 2004, 2008; Fayer *et al.* 2006, 2007; Xiao & Fayer, 2008; Xiao & Feng, 2008). As ovelhas, à semelhança destes últimos também não parecem ser importantes reservatórios de *C. parvum*, encontrando-se maioritariamente infectadas por espécies e genótipos que normalmente não infectam o Homem (Ryan *et al.* 2005; Santín *et al.* 2007). Relativamente aos animais de companhia, estes encontram-se maioritariamente infectados por *C. canis* e *C. felis*, espécies estas muito bem adaptadas ao cão e gato respectivamente (Cacciò *et al.* 2005; Xiao & Fayer, 2008) e, embora ocasionalmente descritas em indivíduos imunocomprometidos (Morgan *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2001; Xiao *et al.* 2001a; Alves *et al.* 2001, 2003; Matos *et al.* 2004; Cama *et al.* 2007), estes animais não parecem ser importantes fontes de infecção (Cacciò *et al.* 2005; Ramirez *et al.* 2004; Xiao & Fayer, 2008; Xiao & Feng, 2008). A importância da transmissão zoonótica é realçada, mais recentemente, num estudo realizado por Hunter *et al.* (2003), no Reino Unido ao

constatar um decréscimo do número de casos de criptosporidiose humana em igual período de tempo em que foram abatidos animais e foi imposto o acesso restrito a terrenos agrícolas devido a uma epidemia de febre aftosa. Esta medida reduziu o contacto do Homem com animais domésticos e selvagens e a sua matéria fecal (Hunter *et al.* 2003), assim como a entrada de oocistos em locais de captação de água (Cacciò *et al.* 2005). O contacto com animais infectados, nomeadamente o gado é, segundo Hunter *et al.* (2004), o principal factor de risco implicado na ocorrência de surtos de criptosporidiose humana devido à infecção por *C. parvum*.

1.3.2. Transmissão antroponótica

A existência de uma segunda via de transmissão foi inicialmente clarificada por Peng *et al.* (1997) ao constatar que o genótipo I, actualmente denominado *C. hominis* apenas descrito no Homem, não era infeccioso para outros animais, enquanto o genótipo II de *C. parvum*, descrito no Homem e bovinos infectava outros animais, sugerindo para além do ciclo de transmissão zoonótico, a existência de um ciclo de transmissão antroponótico. A transmissão entre indivíduos é actualmente reconhecida como uma importante forma de transmissão das espécies de *Cryptosporidium* e, sendo mais frequente em áreas urbanas, ocorre principalmente no seio de famílias, em creches, em ambiente hospitalar, e em outras instituições (Casemore, 1990; Dillingham *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2004; Smith & Nichols, 2007). Adicionalmente, a elevada prevalência de criptosporidiose em indivíduos do sexo masculino homossexuais, sugere a transmissão do parasita via sexual, e realça a importância do contacto directo com pessoas infectadas (Fayer *et al.* 2000; Xiao & Cama, 2006). A transmissão é particularmente comum em crianças das creches devido aos seus baixos padrões higiénicos, e à tendência destas em colocar objectos que manuseiam na boca (Smith & Nichols, 2007). De acordo com Hunter *et al.* (2004) os factores de risco frequentemente associados à transmissão de *C. hominis* compreendem a muda de fraldas em crianças com menos de cinco anos de idade, assim como a realização de viagens para o estrangeiro. A estreita associação entre indivíduos que viajam principalmente para países em desenvolvimento e a infecção por *C. hominis*, sugere que a exposição a baixos padrões de higiene poderá aumentar a probabilidade de transmissão entre pessoas (Ramirez *et al.* 2004; Hunter &

Thompson, 2005). Por sua vez, a forte associação entre a muda de fraldas em crianças assintomáticas e a infecção por *C. hominis* sugere que as crianças muito jovens actuem como importantes reservatórios e fontes de infecção (Hunter *et al.* 2004; Hunter & Thompson, 2005).

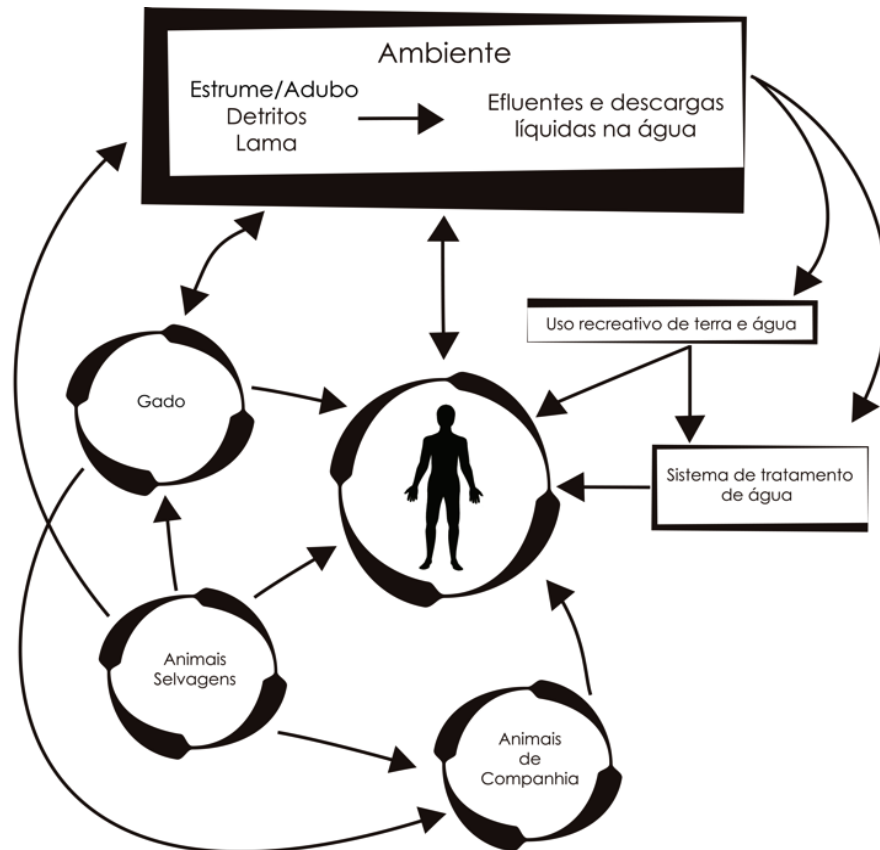


Figura 4. Reservatórios e fontes de infecção implicadas na transmissão de *Cryptosporidium* spp. (baseado em Casemore, 1990).

1.3.3. Transmissão hídrica

A veiculação hídrica dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. através de fontes de água potável ou água de recreio previamente contaminadas, constitui uma das principais e mais frequentes fontes de infecção (Fayer *et al.* 2000; Leav *et al.* 2003; Fayer, 2004; Ramirez *et al.* 2004). Numerosos surtos de criptosporidiose descritos em várias partes do mundo demonstram a natureza relevante da água contaminada como fonte de infecção (Fayer *et al.* 2000), assumindo particular destaque o surto de Milwaukee ocorrido em 1993, onde foram notificados mais de 400.000 casos devido ao consumo de água potável contaminada (Mac Kenzie *et al.* 1994). A elevada prevalência de

criptosporidiose no gado sugeriu, durante algum tempo, que este fosse considerado o principal responsável pela contaminação da água e, consequentemente a causa de vários surtos de origem hídrica (Fayer *et al.* 2000; Fayer, 2004; Olson *et al.* 2004; Cacciò *et al.* 2005). No entanto, estudos moleculares sugerem que a maioria dos surtos, incluindo o de Milwaukee, parece dever-se à contaminação fecal humana das fontes de água (Peng *et al.* 1997; McLauchlin *et al.* 1999; Leav *et al.* 2003; Cacciò *et al.* 2005). Nos Estados Unidos da América (EUA), as espécies mais frequentes em amostras de água de superfície compreendem *C. hominis*, *C. parvum* e *C. andersoni*, corroborando desta forma que quer os humanos quer o gado doméstico constituem as duas principais fontes de contaminação da água de superfície em locais onde este tipo de contaminação ocorre potencialmente (Xiao *et al.* 2001b). Em Portugal, a água também constitui um importante veículo de transmissão de *Cryptosporidium* spp., tendo sido identificadas as espécies *C. andersoni*, *C. muris*, *C. hominis* e *C. parvum* (Lobo *et al.* 2009). Os subtipos destas últimas duas espécies já foram identificados em doentes com sida e, em bovinos e doentes com sida, respectivamente, identificando quer os humanos quer os bovinos como importantes fontes de contaminação da água (Alves *et al.* 2003, 2006; Lobo *et al.* 2009). Também os animais selvagens parecem ser importantes reservatórios de oocistos de criptosporídeos e os responsáveis pela contaminação da água pluvial em Nova Iorque (Xiao *et al.* 2000b). Actualmente conhecem-se várias causas que promovem a contaminação da água de abastecimento, nomeadamente o escoamento urbano e agrícola, a poluição industrial, fezes humanas e animais e, principalmente, a água pluvial, a qual promove o transporte de materiais contaminados com fezes (Xiao *et al.* 2000b; Fayer, 2004; Ramirez *et al.* 2004; Smith & Nichols, 2007; Lobo *et al.* 2009). Nos países em desenvolvimento, particularmente nas áreas propensas a inundações, o risco de infecção pela água é particularmente elevado, tendo em conta que o sistema de saneamento básico nestes países revela-se ainda bastante precário (Thompson & Smith, 2011). Os surtos de criptosporidiose encontram-se também associados à água de recreio, como piscinas, que normalmente são frequentadas por crianças, bebés que usam fralda e pessoas incontinentes, o que, aliado às características do oocisto e, à elevada densidade de utilizadores facilita a transmissão deste parasita entre indivíduos e realça, indirectamente, a importância da transmissão antroponótica nos ambientes urbanos (Fayer *et al.* 2000; Dillingham *et al.* 2002; Fayer, 2004).

1.3.4. Transmissão alimentar

O consumo de alimentos contaminados promove a ocorrência de casos clínicos de criptosporidiose humana, em particular o consumo de salsichas, leite, salada de frango, vegetais crus, cidra e bivalves (Casemore, 1990; Fayer *et al.* 2000; Dillingham *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003; Xiao & Cama, 2006) e, uma vez que a grande maioria destes alimentos são consumidos crus, a presença de oocistos nestes é extremamente relevante ao nível da saúde pública (Xiao & Cama, 2006). Para além do consumo de alimentos, a criptosporidiose alimentar tem uma forte associação com a manipulação de alimentos por manipuladores com mãos previamente contaminadas (Quiroz *et al.* 2000). Quiroz *et al.* (2000) para além de identificarem o manipulador como a fonte de infecção, demonstraram que todos os isolados implicados no surto epidémico eram de origem humana, e verificaram que todas as sequências eram uniformes no *locus* SSU rRNA sugerindo uma fonte de contaminação comum única. Outras fontes de infecção frequentemente implicadas na contaminação alimentar compreendem fertilizantes de origem animal contaminados ou fezes humanas, água de rega contaminada, e superfícies contaminadas utilizadas na embalagem, preparação e armazenamento de alimentos (Fayer *et al.* 2000; Xiao & Cama, 2006). Anualmente estima-se que podem ocorrer seis milhões de casos de transmissão de *Cryptosporidium* spp. por alimentos na região mediterrânica oriental, e até 27 milhões na região africana (Thompson & Smith, 2011).

1.3.5. Transmissão mecânica por vectores

Por último, e embora descrito menos frequentemente encontra-se o papel dos vectores no transporte mecânico dos oocistos, os quais apresentam um papel relativamente importante ao facilitar a propagação dos oocistos no ambiente (Xiao, 2009). As moscas, baratas, besouros e escaravelhos são os vectores mais frequentemente implicados (Dillingham *et al.* 2002; Xiao, 2009), assim como os bivalves (Xiao, 2009). Em condições experimentais já foram descritos casos onde os oocistos foram transportados mecanicamente por invertebrados, moscas e caranguejos, o que realça o importante papel destes potenciais vectores na disseminação dos oocistos no ambiente (Fayer *et al.* 2000; Xiao, 2009).

1.4. Criptosporidiose

1.4.1. Prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. no Homem

A infecção por *Cryptosporidium* spp. é ubíqua e tem sido descrita em vários países dos seis continentes (Fayer & Ungar, 1986; Current & Garcia, 1991; Fayer *et al.* 2000; Kosek *et al.* 2001; Dillingham *et al.* 2002). Os países em desenvolvimento apresentam uma elevada prevalência desta doença comparativamente aos países desenvolvidos. Na Europa a prevalência de oocistos nas fezes de indivíduos com gastroenterite foi 1 a 2% e na América do Norte 0,6 a 4,3%, enquanto na África, Ásia, Austrália, América do Sul e Central têm sido descritas prevalências entre 3 e 20% (Fayer & Ungar, 1986; Current & Garcia, 1991). Outras pesquisas corroboram esta tendência e sugerem que esta diferença deve-se sobretudo à carência de água potável limpa e às instalações higieno-sanitárias precárias nos países em desenvolvimento (Current & Garcia, 1991; Fayer *et al.* 2000; Fayer, 2004).

Os casos de criptosporidiose nos países desenvolvidos são sobretudo devidos a surtos esporádicos e apresentam uma prevalência de 2,1% nos indivíduos imunocompetentes, o que contrasta com a situação endémica dos países em desenvolvimento, onde aproximadamente 6,1% dos indivíduos imunocompetentes apresentam diarreia devido à infecção por *Cryptosporidium* spp. (Guerrant, 1997; Chen *et al.* 2002; Dillingham *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003). As crianças constituem por sua vez um grupo particularmente susceptível à criptosporidiose, nomeadamente nos países desenvolvidos a percentagem de crianças infectadas por *Cryptosporidium* spp. com diarreia alcança os 7%, enquanto nos países em desenvolvimento a doença ocorre em maior proporção, podendo chegar até aos 12% das crianças com diarreia (Chen *et al.* 2002). As pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humano (VIH) constituem, à semelhança das crianças, um grupo de risco muito susceptível à infecção por *Cryptosporidium* spp. (Chen *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003). Nos países desenvolvidos, a prevalência de doentes seropositivos para VIH com diarreia pode ir até aos 14%, enquanto nos países em desenvolvimento, a prevalência nestes doentes sobe para 24% (Guerrant, 1997; Chen *et al.* 2002; Dillingham *et al.* 2002). Em Portugal a prevalência de criptosporidiose nos doentes com sida é de 8% (36/465) (Matos *et al.* 1998). Um estudo de 1986 realizado nos EUA reflecte a elevada susceptibilidade destes doentes à

criptosporidiose ao demonstrar que 3,6% dos 19.817 doentes com sida teve criptosporidiose, e a sua taxa de mortalidade foi de 61% (Fayer, 2004).

Os estudos seroepidemiológicos, os quais proporcionam uma boa indicação do nível de exposição de uma determinada população a criptosporídeos (O'Donoghue, 1995), revelam que a infecção por *Cryptosporidium* spp. é comum nas diversas áreas geográficas desenvolvidas, contudo praticamente universal nas áreas geográficas mais empobrecidas (Kosek *et al.* 2001). Mais concretamente, cerca de 20 a 30% dos adultos jovens dos EUA apresentam no soro níveis mensuráveis de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* (Kosek *et al.* 2001; Dillingham *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003), o que contrasta com a situação endémica dos países em desenvolvimento, onde 50 a 75% das crianças residentes na zona rural da China, entre os oito e 13 anos de idade, apresentam anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium*. No Brasil a seroprevalência foi de 90% em crianças com cerca de um ano de idade (Guerrant *et al.* 1997; Kosek *et al.* 2001; Dillingham *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003).

1.4.2. Prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. no gado doméstico

A infecção por *Cryptosporidium* spp. tem sido descrita numa grande variedade de animais domésticos e selvagens, sendo contudo mais frequente nos mamíferos (Fayer *et al.* 2000; Xiao *et al.* 2004; Ramirez *et al.* 2004), particularmente no gado doméstico, cuja infecção por *Cryptosporidium* spp. tem sido descrita a nível mundial (Fayer, 2004). O interesse por este parasita aumentou no domínio veterinário devido às elevadas perdas económicas no sector da pecuária, tem provado ser de difícil controlo, e porque os animais constituem fonte de infecção para os humanos (de Graaf *et al.* 1999; Ramirez *et al.* 2004). De entre o gado bovino, têm particular destaque os vitelos, os quais normalmente são infectados entre uma a quatro semanas de idade (Olson *et al.* 2004). No Canadá, Olson *et al.* (1997) demonstraram que a prevalência de infecção nos bovinos foi de 20% (21/104), de entre os quais os mais jovens tinham uma prevalência de infecção mais elevada. No Reino Unido, um estudo longitudinal realizado entre 1992 a 1997 registou uma prevalência de infecção de apenas 3,5% (18/516) em bovinos adultos, enquanto nos vitelos, à semelhança do estudo anterior, a prevalência foi mais elevada alcançando os 52% (191/367) (Sturdee *et al.* 2003). Também numa exploração

leiteira na Holanda, a infecção por *Cryptosporidium* spp. foi mais elevada em vitelos com uma a três semanas de idade (39,1%; 18/46) (Huetink *et al.* 2001). Mais recentemente, um estudo longitudinal realizado nos EUA corrobora a existência de uma associação entre a idade e a prevalência de infecção nestes animais. Neste estudo, os autores observaram que enquanto nos vitelos não desmamados até dois meses de idade a prevalência de infecção foi de 41% (161/393), nos vitelos desmamados, com idades entre três a 11 meses, a prevalência diminuiu para 26,2% (117/447) (Santín *et al.* 2004). Prevalências significativamente mais baixas foram registradas em animais mais adultos, nomeadamente 11,9% (68/571) em vitelos com 12 a 24 meses de idade, e 5,7% (31/541) em bovinos com mais de dois anos de idade (Fayer *et al.* 2006, 2007). Um segundo estudo realizado nos EUA corrobora esta tendência, tendo verificado que a prevalência de infecção é mais elevada nos vitelos não desmamados comparativamente aos vitelos desmamados e jovens (Santín *et al.* 2008).

A infecção por *Cryptosporidium* spp. é comum também nos pequenos ruminantes, e na presença de adultos assintomáticos, mais de 75% dos recém-nascidos são infectados (de Graaf *et al.* 1999). Um estudo realizado na Roménia refere que a prevalência de infecção em caprinos foi 24% (99/412) (Bejan *et al.* 2009), enquanto nos ovinos dos EUA, do Canadá e da Austrália foram obtidas prevalências respectivamente de 50,8% (32/63), 23,6% (21/89) e 26,2% (131/500) (Olson *et al.* 1997; Ryan *et al.* 2005; Santín *et al.* 2007). A infecção é também mais prevalente nos recém-nascidos, nomeadamente 39,4% dos caprinos infectados tinham uma a duas semanas de idade (Bejan *et al.* 2009), enquanto estudos realizados no Reino Unido e nos EUA revelam que a prevalência de infecção em cordeiros e ovelhas foi respectivamente de 12,9% (33/255) e 77,4% (24/31) nos cordeiros, e 6,4% (16/250) e 25% (8/32) nas ovelhas (Sturdee *et al.* 2003; Santín *et al.* 2007). Nos suínos, a informação epidemiológica é mais escassa, contudo alguns trabalhos referem prevalências de 11% (26/236) no Canadá, 22,5% (32/142) na Espanha, 34,2% (89/260) na Sérvia e 22,1% (64/289) na Austrália (Olson *et al.* 1997; Mišić *et al.* 2003; Suárez-Luengas *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2008). Nestes, a infecção parece ser mais prevalente nos animais com um a três meses de idade (Misic *et al.* 2003; Suárez-Luengas *et al.* 2007) e, nomeadamente na Austrália a prevalência de infecção em leitões não desmamados e desmamados foi respectivamente de 10,6% (13/123) e 32,7% (51/156) (Johnson *et al.* 2008).

1.4.3. Fisiopatologia da diarreia causada pela infecção por *Cryptosporidium* spp.

Os mecanismos exactos pelos quais as espécies de *Cryptosporidium* provocam diarreia são complexos (Gookin *et al.* 2002), e ainda não se encontram totalmente clarificados (Chen *et al.* 2002; Okhuysen & Chappell, 2002; Tzipori & Ward, 2002; Leav *et al.* 2003; Carey *et al.* 2004; Chalmers & Davies, 2010), contudo reflectem uma etiologia multifactorial já que dependem do efeito do parasita no hospedeiro, e das respostas inflamatórias e imunológicas deste (Chalmers & Davies, 2010). A presença de *Cryptosporidium* spp. no epitélio gastrointestinal sugere a ocorrência de efeitos adversos directos na estrutura e função deste tecido (Gookin *et al.* 2002), nomeadamente atrofia severa das vilosidades, que resulta da perda contínua de enterócitos localizados à superfície, com encurtamento e fusão das vilosidades (figura 5), assim como alongamento e hiperplasia das células das criptas. Estas alterações normalmente são acompanhadas de infiltrações de células na lâmina própria (Chen *et al.* 2002; Gookin *et al.* 2002; Tzipori & Ward, 2002; Chalmers & Davies, 2010). A atrofia das vilosidades reduz a superfície de absorção do epitélio, a captação de fluidos, electrólitos e nutrientes a partir do lúmen intestinal, e conduz à perda de enzimas digestivas ligadas à membrana (Tzipori & Ward, 2002; Chalmers & Davies, 2010). As alterações morfoanatômicas das vilosidades, de acordo com modelos animais, promovem a diminuição da absorção de nutrientes acoplados ao sódio (Na^+) e água (H_2O), acompanhadas do aumento da secreção de cloro (Cl^-) (Clark, 1999; Gookin *et al.* 2002; Okhuysen & Chappell, 2002; Carey *et al.* 2004; Chalmers & Davies, 2010).

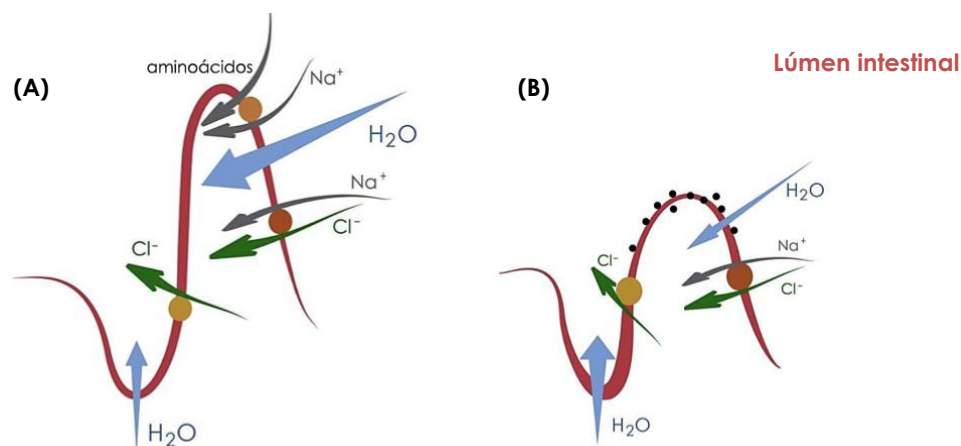


Figura 5. Fisiopatologia da criptosporidiose. (A) Mecanismo fisiológico normal do epitélio intestinal. (B) Mecanismo fisiopatológico da criptosporidiose. Sódio (Na^+), Cloro (Cl^-), Água (H_2O), *Cryptosporidium* spp. (●). A direcção das setas indica o fluxo dos iões e da água (adaptado e modificado de Gookin *et al.* 2002).

A natureza secretória da diarreia sugere ainda a presença de uma enterotoxina, contudo ainda não se conseguiu isolar e purificar nenhuma até ao momento (Chen *et al.* 2002; Gookin *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003; Chalmers & Davies, 2010). Outros estudos sugerem que a etiologia da diarreia secretória é mediada por prostaglandinas, as quais têm a capacidade de inibir a absorção de cloreto de sódio (NaCl) pelos enterócitos da superfície luminal, ao mesmo tempo que induzem a secreção de aniões, como o Cl⁻ ou o bicarbonato (HCO₃⁻) pelos enterócitos das criptas (Gookin *et al.* 2002). As espécies de *Cryptosporidium* apresentam ainda a capacidade de promover a activação de vias apoptóticas nas células vizinhas não infectadas, ao mesmo tempo que activam vias de sobrevivência nas células infectadas, de forma a garantir e prolongar a sobrevivência no organismo hospedeiro à medida que afectam as funções normais do epitélio intestinal (Gookin *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002; Okhuysen & Chappell, 2002; Leav *et al.* 2003).

1.4.4. Manifestações clínicas nos humanos e nos animais

Nos indivíduos imunocompetentes a doença geralmente é assintomática (Chen *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003; Borad & Ward, 2010) ou autolimitada (Chen *et al.* 2002; Chalmers & Davies, 2010). O sintoma mais notável e comumente descrito é a diarreia, normalmente aquosa e profusa (Chen *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003; Fayer, 2004; Ramirez *et al.* 2004; Xiao, 2009; Chalmers & Davies, 2010) que surge após um período de incubação de sete a 10 dias (Chen *et al.* 2002), podendo ocasionalmente apresentar muco, mas sem sangue ou leucócitos (Chen *et al.* 2002; Fayer, 2004; Chalmers & Davies, 2010). Na grande maioria dos casos clínicos, a diarreia é acompanhada de vômitos, náuseas, dores abdominais, febre, fadiga, desidratação e perda de peso (Chen *et al.* 2002; Leav *et al.* 2003; Fayer, 2004; Ramirez *et al.* 2004; Chalmers & Davies, 2010). Os sintomas decorrem durante cerca de duas a três semanas (Chen *et al.* 2002; Borad & Ward, 2010; Chalmers & Davies, 2010), contudo alguns indivíduos poderão apresentar diarreia persistente que pode perdurar por um mês ou mais (Leav *et al.* 2003; Borad & Ward, 2010; Chalmers & Davies, 2010).

Nas crianças a criptosporidiose representa uma das principais causas de diarreia, particularmente nos países em desenvolvimento (Clark, 1999; Khan *et al.* 2004; Borad & Ward, 2010), onde a doença é endémica (Newman *et al.* 1999). A criptosporidiose

surge principalmente em crianças com idade inferior a dois anos (Borad & Ward, 2010; Chalmers & Davies, 2010). Nomeadamente Khan *et al.* (2004) observaram que 96% (44/46) das crianças infectadas por *Cryptosporidium* spp. tinham menos de dois anos de idade, enquanto nos países desenvolvidos as crianças parecem ser infectadas mais tardiamente, provavelmente devido às melhores condições higiénicas (Sulaiman *et al.* 2005; Xiao & Cama, 2006). Os sintomas mais frequentemente observados na criptosporidiose infantil são semelhantes aos descritos nos indivíduos imunocompetentes (Huang *et al.* 2004; Khan *et al.* 2004). Contudo, contrariamente a estes últimos, já foram descritos sangue oculto, leucócitos e lactoferrina nas fezes das crianças sintomáticas com criptosporidiose (Newman *et al.* 1999). A diarreia persistente em crianças, muito frequente nos países em desenvolvimento, parece ter efeitos adversos a longo prazo e, eventualmente, até devastadores uma vez que conduz a problemas subsequentes no desenvolvimento físico e na função cognitiva (Leav *et al.* 2003; Huang *et al.* 2004; Borad & Ward, 2010).

Contrariamente aos indivíduos imunocompetentes, os imunocomprometidos são particularmente susceptíveis à infecção por *Cryptosporidium* spp., nomeadamente aqueles com sida, doentes sujeitos a quimioterapia e transplantados (Clark, 1999; Hunter & Nichols, 2002; Carey *et al.* 2004; Xiao & Cama, 2006; Borad & Ward, 2010; Chalmers & Davies, 2010), ou com a síndrome de hiperimmunoglobulina M (Hunter & Nichols, 2002; Huang *et al.* 2004; Chalmers & Davies, 2010). A duração e severidade da infecção reflectem o nível de imunossupressão do organismo e, especialmente nos indivíduos infectados por VIH/sida a ocorrência de criptosporidiose está relacionada com o número de células T CD4⁺ (Fayer, 2004; Xiao & Cama, 2006; Borad & Ward, 2010). Os doentes cujas contagens de células T CD4⁺ são inferiores a 150 cél/mm³ manifestam doença persistente (Tzipori & Ward, 2002). Particularmente nos doentes com sida, a criptosporidiose é muito severa, por vezes intratável e manifesta-se por diarreia crónica (Fayer, 2004; Xiao & Cama, 2006; Chalmers & Davies, 2010; Putignani & Menichella, 2010), com perdas consideráveis de fluido e peso corporal, o que conduz a desidratação severa, má absorção e desnutrição, podendo nalguns casos conduzir à morte (Chen *et al.* 2002; Hunter & Nichols, 2002; Ramirez *et al.* 2004; Putignani & Menichella, 2010). Na maioria dos casos a infecção ocorre no tracto intestinal, contudo em doentes com sida a infecção pode ocorrer em outros sistemas ou

órgãos, sendo mais frequente nos canais biliares, causando colangite (Clark, 1999; Chen *et al.* 2002; Hunter & Nichols, 2002; Tzipori & Ward, 2002; Chalmers & Davies, 2010).

As diversas manifestações clínicas dependem também das características de virulência das espécies e subtipos envolvidos na criptosporidiose humana (Cama *et al.* 2007; Chalmers & Davies, 2010). Vários estudos referem que os indivíduos infectados por *C. hominis* apresentam um maior número de oocistos excretados e um período patente relativamente maior comparativamente aos indivíduos infectados por *C. parvum* (McLauchlin *et al.* 1999; Xiao *et al.* 2001a; Matos *et al.* 2004). Cama *et al.* (2007) demonstraram ainda em doentes infectados por VIH que a espécie mais patogénica foi a família IIc de *C. parvum* devido à forte associação com diarreia crónica e vômito, seguida de *C. canis* e *C. felis*.

À semelhança dos humanos, os animais em geral apresentam diversos sintomas clínicos (Fayer, 2004). Os animais mais jovens são mais susceptíveis à infecção sendo registada uma elevada mortalidade em recém-nascidos de muitas espécies, especialmente de ruminantes, enquanto nos animais mais adultos a infecção é sobretudo assintomática, embora nalguns casos estes possam apresentar sintomas leves de patologia gastrointestinal (O'Donoghue, 1995; Ramirez *et al.* 2004). Nos vitelos a criptosporidiose dura aproximadamente cerca de duas semanas (Olson *et al.* 2004), enquanto nos pequenos ruminantes a diarreia pode durar apenas alguns dias, ou ir até uma a duas semanas em casos moderados e severos, respectivamente (de Graaf *et al.* 1999). Nos ruminantes recém-nascidos a infecção caracteriza-se sobretudo pela diarreia aquosa e profusa, com uma coloração amarelo pálida e um cheiro pútrido, possuindo muco. Na maioria dos casos clínicos, os animais apresentam adicionalmente febre, apatia, anorexia, desidratação, perda de peso, fraqueza, dor abdominal, pelo áspero e, por vezes, inchaço (O'Donoghue, 1995; de Graaf *et al.* 1999; Fayer, 2004; Olson *et al.* 2004; Ramirez *et al.* 2004). Nas primeiras semanas de vida estes animais apresentam atraso no crescimento como resultado da anorexia e perda de peso (de Graaf *et al.* 1999). Os casos mais severos podem resultar em morte devido à desidratação severa e colapso cardiovascular (Olson *et al.* 2004). Por oposição aos ruminantes, a infecção nos suínos é na maioria dos casos clínicos assintomática e geralmente de baixa intensidade (de Graaf *et al.* 1999; Ramirez *et al.* 2004).

1.5. Diagnóstico microscópico e molecular

A infecção por *Cryptosporidium* spp. desenvolve, na maioria dos indivíduos, manifestações clínicas vulgares, semelhantes a gastroenterites causadas por outros agentes etiológicos (Chalmers & Davies, 2010) sendo necessário o diagnóstico específico de criptosporidiose, assim como a identificação e caracterização das várias espécies envolvidas na infecção (Jex *et al.* 2008a). A detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras biológicas e ambientais tem sido realizada tradicionalmente por microscopia (Jex *et al.* 2008a). Esta pode ser realizada recorrendo a várias abordagens, contudo, mais frequentemente a pesquisa é realizada por microscopia após coloração dos esfregaços fecais (Xiao & Cama, 2006). De entre as várias colorações, as ácido-resistente, nomeadamente Kinyoun e Ziehl-Neelsen modificada são as mais frequentemente utilizadas (Sunnotel *et al.* 2006; Xiao & Cama, 2006), uma vez que permitem a distinção dos oocistos de detritos fecais e leveduras, conforme se observa na figura 6 (O'Donoghue, 1995; Jex *et al.* 2008a). A abordagem do diagnóstico parasitológico é muito útil, em particular nos países em desenvolvimento, uma vez que não requer microscópios específicos, tem baixo custo, é de fácil utilização, e permite a detecção simultânea de outros parasitas (Sunnotel *et al.* 2006; Xiao & Cama, 2006). Contudo apresenta algumas desvantagens, em particular a baixa sensibilidade e especificidade das colorações, assim como a necessidade de um profissional devidamente treinado (Leav *et al.* 2003; Jex *et al.* 2008a).

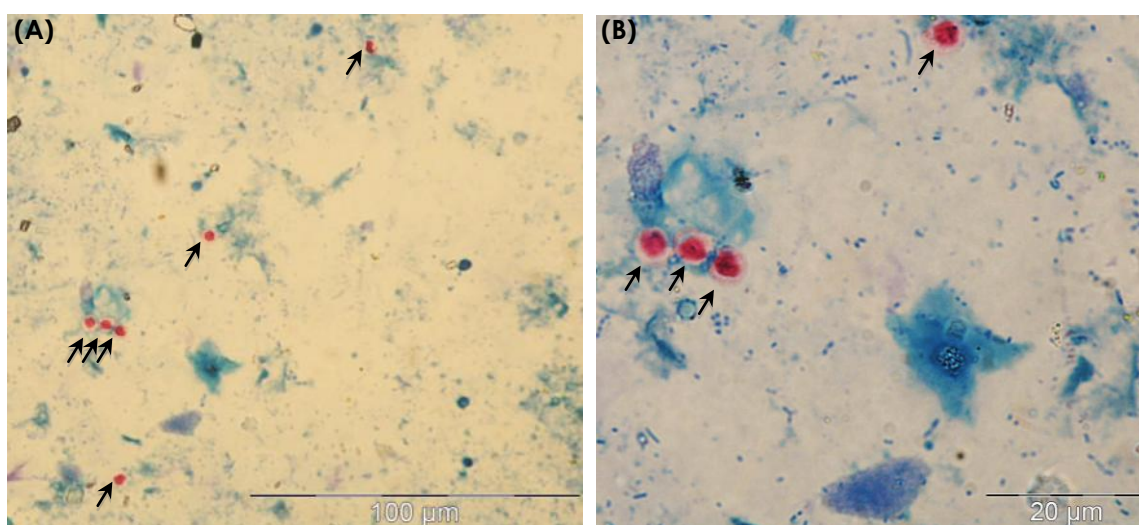


Figura 6. Isolado de *C. parvum* corado por Ziehl-Neelsen modificado. (A) Isolado observado a x400. (B) Isolado observado a x1000. Os oocistos corados de vermelho brilhante encontram-se assinalados pelas setas. Fotografias da autora.

Mais recentemente, os países desenvolvidos têm utilizado amplamente a microscopia de fluorescência para a detecção dos oocistos (Xiao & Cama, 2006), a qual emprega anticorpos anti-*Cryptosporidium* específicos conjugados com fluoróchromos dirigidos aos epítomos de hidratos de carbono localizados na parede dos oocistos (Carey *et al.* 2004; Xiao & Cama, 2006; Jex *et al.* 2008a). Comparativamente à coloração diferencial revela elevada especificidade e sensibilidade na detecção destes parasitas, quer em esfregaços fecais, quer em amostras ambientais (Xiao & Cama, 2006; Jex *et al.* 2008a). No entanto, esta metodologia apresenta algumas limitações das quais se destacam a necessidade de um microscópio de fluorescência e a ocorrência de reactividade cruzada (Carey *et al.* 2004). As metodologias *enzyme-linked-immunosorbent assay* (ELISA) e os ensaios imunocromatográficos permitem a detecção de antígenos nas amostras fecais e, apresentam elevada especificidade, contudo em ambas as metodologias a sensibilidade parece ser significativamente mais reduzida comparativamente à imunofluorescência (Sunnotel *et al.* 2006; Xiao & Cama, 2006; Jex *et al.* 2008a). A pesquisa de coproantígenos não requer um profissional experiente na microscopia e permite processar um grande número de amostras simultaneamente (Xiao & Cama, 2006; Jex *et al.* 2008a; Chalmers & Davies, 2010).

As abordagens microscópicas e imunológicas descritas não permitem a identificação da espécie ou do genótipo envolvido na infecção (Jex *et al.* 2008a) e, consequentemente, têm sido desenvolvidas técnicas moleculares que permitem não somente o diagnóstico específico de criptosporidiose em humanos e animais e a identificação das espécies, mas também a detecção de variação genética dentro e entre as espécies nos vários tipos de amostras (Xiao & Cama, 2006; Jex *et al.* 2008a). De entre as várias técnicas moleculares, a reacção em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) oferece um diagnóstico rápido, preciso e permite, adicionalmente, inferir a fonte de infecção implicada (Morgan & Thompson, 1998). O princípio desta metodologia baseia-se na amplificação específica de um ou mais *loci* a partir de pequenas quantidades de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), e tem contribuído para a compreensão da sistemática, biologia, epidemiologia, ecologia e genética das várias espécies de *Cryptosporidium*, e como tal, possibilitado o planeamento de estratégias de vigilância, prevenção e controlo da criptosporidiose, quer em humanos quer em animais (Jex *et al.* 2008a).

1.6. Abordagem terapêutica e profiláctica

Actualmente o tratamento e controlo da infecção por *Cryptosporidium* spp. revela-se ainda limitado apesar das inúmeras pesquisas, quer em medicamentos quer em estratégias terapêuticas (Fayer, 2004; Chalmers & Davies, 2010). Diversos compostos farmacêuticos têm sido seleccionados por demonstrarem actividade anti-*Cryptosporidium in vitro* ou em animais de laboratório (Xiao & Cama, 2006), e embora já tenha sido demonstrado que alguns conseguem reduzir a magnitude dos sintomas, nenhum consegue eliminar eficazmente o parasita (Ramirez *et al.* 2004).

A nitazoxanida compreende o único agente antimicrobiano aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para o tratamento da diarreia infantil causada por *C. parvum* (Ramirez *et al.* 2004; Xiao & Cama, 2006). Este fármaco tem demonstrado em numerosos ensaios clínicos a capacidade de reduzir a duração clínica da doença e a carga parasitária em indivíduos seronegativos para VIH (Fayer, 2004; Xiao & Cama, 2006) contudo não está aprovado para o tratamento de criptosporidiose em imunocomprometidos (Xiao & Cama, 2006). Neste grupo de risco, a paromomicina e a espiramicina têm sido utilizadas no tratamento de alguns doentes (Xiao & Cama, 2006). A incidência da criptosporidiose, assim como outras doenças oportunistas nos doentes infectados por VIH diminuiu drasticamente com a introdução da terapia anti-retroviral altamente activa (HAART, do inglês *highly active antiretroviral therapy*) (Clark, 1999; Fayer, 2004; Xiao & Cama, 2006; Chalmers & Davies, 2010), a qual permite reconstituir o número de linfócitos T CD4⁺ e, portanto, restabelecer a função imunológica do organismo (Clark, 1999; Xiao & Cama, 2006; Putignani & Menichella, 2010). Estudos *in vitro* e em animais de laboratório sugerem também que os inibidores de proteases utilizados na HAART têm um efeito directo no desenvolvimento do parasita, o que reduz a invasão das células hospedeiras (Xiao & Cama, 2006; Chalmers & Davies, 2010). Nos indivíduos imunocompetentes, o seu sistema imune consegue debelar a infecção sem a necessidade de recorrer a fármacos específicos (Hunter & Nichols, 2002; Chalmers & Davies, 2010). Nestes, a reidratação oral ou intravenosa compreende o tratamento de eleição para diminuição da sintomatologia (Clark, 1999; Ramirez *et al.* 2004; Chalmers & Davies, 2010). Actualmente, e apesar do conhecimento da importância da imunidade celular e das várias tentativas para identificar os antígenos responsáveis pela estimulação de uma resposta imunológica

protectora, ainda não se encontram disponíveis vacinas para a prevenção ou tratamento da criptosporidiose humana ou animal (Fayer, 2004). Relativamente às medidas profiláticas, a lavagem das mãos antes de comer ou preparar alimentos e após o contacto com animais, o tratamento adequado de água não potável e a lavagem de frutas e verduras antes do seu consumo são medidas dinâmicas que permitem reduzir significativamente o risco de infecção. Os responsáveis que tomam conta de crianças ou adultos que usam fralda, assim como os responsáveis pela eliminação e lavagem de materiais sujos, devem lavar as mãos mais frequentemente (Chalmers & Davies, 2010). Por outro lado, os indivíduos infectados não devem frequentar a escola ou o local de trabalho durante pelo menos 48 horas após o último episódio de diarreia, particularmente os manipuladores de alimentos (Chalmers & Davies, 2010). No que respeita à água de recreio devem ser desenvolvidas estratégias para resposta a acidentes fecais, como fraldas de natação e educação dos profissionais e dos utilizadores dessas instalações, assim como implementar medidas que visam reduzir a transmissão, nomeadamente evitar a utilização de piscinas durante episódios de diarreia, prevenir a deglutição desta água, promover pausas para as crianças irem à casa de banho, e tomar banho antes da utilização da piscina para remover resíduos fecais (Fayer, 2004).

Relativamente aos animais, vários medicamentos têm sido testados para o tratamento de criptosporidiose, contudo só alguns têm demonstrado alguma eficácia. A paromomicina e o decoquinato diminuem a excreção de oocistos e melhoram a frequência e gravidade da diarreia em vitelos e cordeiros. O lactato de halofuginona, outra alternativa terapêutica para a criptosporidiose no gado bovino, reduz a incidência e a gravidade da diarreia, contudo não impede a excreção de oocistos (Olson *et al.* 2004). Também a administração de colostro bovino, com elevados títulos de anticorpos anti-*Cryptosporidium* aos recém-nascidos, parece reduzir a severidade da diarreia e a excreção dos oocistos, no entanto, a reidratação oral é fundamental para a redução da sintomatologia. Medidas profiláticas dinâmicas que permitem reduzir a transmissão das espécies de *Cryptosporidium* nesta população compreendem a adopção de medidas higiénicas adequadas e direccionadas, a separação dos animais jovens dos adultos, a redução da densidade de animais no mesmo espaço físico, a minimização do contacto entre os trabalhadores e os vitelos, assim como a gestão de um curto período de tempo para o nascimento dos animais (Ramirez *et al.* 2004).

1.7. Epidemiologia molecular

1.7.1. Caracterização molecular

Actualmente existem vários modelos de propagação *in vitro* para as diversas espécies de *Cryptosporidium*, os quais têm permitido a investigação ao nível do ciclo de vida e da biologia destes protozoários (Current & Garcia, 1991; Hijjawi *et al.* 2004; Borowski *et al.* 2010), contudo, estes revelam-se ainda bastante limitados a vários níveis, destacando-se a sua incapacidade na propagação contínua a longo prazo destes parasitas. Por outro lado, as particularidades a nível genómico destes protozoários (o genoma de *C. parvum* é relativamente pequeno, composto por oito cromossomas, com um tamanho total estimado entre 9,6 a 10,4 megabases), e o impacto destes na comunidade médica tornam-nos candidatos ideais para estudos de biologia molecular (Piper *et al.* 1998). Os *loci* COWP, as proteínas de adesão relacionada com a trombospondina (TRAP, do inglês *thrombospondin-related adhesive protein*) em *C. parvum* (TRAP-C1 e TRAP-C2), a HSP70 e a actina foram amplamente utilizados na caracterização das várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* nos humanos e nos animais (quadro III) (Peng *et al.* 1997; Spano *et al.* 1997, 1998; Sulaiman *et al.* 1998, 2000, 2001, 2002; McLauchlin *et al.* 1999, 2000; Alves *et al.* 2001; Xiao *et al.* 2002, 2004). Mais recentemente, os estudos epidemiológicos e a caracterização e classificação das espécies, genótipos e subtipos de *Cryptosporidium* têm sido realizados através do emprego dos *loci* SSU rRNA e glicoproteína de 60-kDa (GP60) (Jex *et al.* 2008a).

Quadro III. Marcadores moleculares utilizados na caracterização de espécimes de *Cryptosporidium*

<i>Locus</i>	Utilidade do poder discriminatório
COWP	Identificação de espécies e genótipos estreitamente relacionados com <i>C. parvum</i> Discrimina entre: <i>C. hominis</i> e <i>C. parvum</i> ; <i>C. parvum</i> e <i>C. wrairi</i> ; <i>C. parvum</i> e <i>C. meleagridis</i>
TRAP	Discrimina entre: <i>C. parvum</i> e <i>C. hominis</i> Ocorrência de variação intra-alélica dentro da espécie <i>C. hominis</i> no <i>locus</i> TRAP-C2
HSP70	Elevada heterogeneidade de sequência torna-o ideal para estudos de genotipagem Já permitiu a discriminação de seis subgenótipos dentro da espécie <i>C. hominis</i> Marcador robusto para análises filogenéticas de espécies de <i>Cryptosporidium</i> próximas
Actina	Elevado carácter polimórfico Marcador robusto para análises filogenéticas de espécies de <i>Cryptosporidium</i> próximas

1.7.1.1. Locus SSU rRNA

Os genes SSU rRNA das espécies *C. muris* e *C. parvum* foram inicialmente clonados por Cai *et al.* (1992). Nesta última espécie, Le Blancq *et al.* (1997) demonstraram que os genes que codificam o rRNA citoplasmático, à semelhança de outros parasitas do filo Apicomplexa, estão organizados em unidades de transcrição denominadas ácido desoxirribonucleico ribossômico (rDNA, do inglês *ribosomal deoxyribonucleic acid*), as quais apresentam a estrutura padrão: 5' SSU rRNA – espaçador de transcrição interna 1 (ITS1, do inglês, *internal transcribed spacer 1*) – 5,8S rRNA – espaçador de transcrição interna 2 (ITS2, do inglês, *internal transcribed spacer 2*) – subunidade grande do rRNA (LSU rRNA, do inglês *large subunit ribosomal ribonucleic acid*) 3'. O genoma haplóide de *C. parvum* possui cinco cópias de unidades rDNA, as quais se encontram dispersas pelos cromossomos, I, II, VII + VIII, tendo-se ainda demonstrado a existência de dois tipos de rDNA, quatro cópias são do tipo A e uma é do tipo B (Le Blancq *et al.* 1997). Estes autores (Le Blancq *et al.* 1997) sugeriram ainda que ambos os tipos de rDNA são transcritos eficazmente, uma vez que têm a mesma estrutura geral e são susceptíveis de ter um promotor e processamento de sinais apropriados.

As regiões dos genes rRNA evoluíram a diferentes ritmos e, caracteristicamente, as suas sequências-alvo variam entre sequências altamente conservadas a sequências altamente variáveis, específicas relativamente à espécie (Vesey *et al.* 1998). De entre estes, o gene SSU rRNA das espécies de *Cryptosporidium* tem sido amplamente utilizado na genotipagem de *Cryptosporidium* spp. nos humanos, nos animais e nas amostras de água (Xiao, 2010), uma vez que para além de evoluir lentamente, caracteriza-se sobretudo pela presença de regiões polimórficas, alternadas com regiões conservadas devido a variações na sequência limitadas a várias regiões do gene (Xiao *et al.* 2004). Estas características tornam este marcador molecular extremamente útil na identificação de espécies de *Cryptosporidium*, uma vez que este apresenta variações de sequência intraespecífica relativamente baixa, contudo, variações interespecíficas relativamente elevadas (Jex *et al.* 2008a). Xiao *et al.* (1999a, 1999b) identificaram neste gene quatro regiões potenciais de interesse, uma vez que revelaram variabilidade suficiente para discriminar as várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* (quadro IV). Por outro lado, a existência de regiões semi-conservadas e regiões hipervariáveis

permite, para além da identificação das várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, o desenho de oligonucleótidos iniciadores específicos do género (Ferguson *et al.* 2006; Xiao, 2009, 2010). Também a existência de várias cópias no genoma, 20 por oocisto (Le Blancq *et al.* 1997), melhoram significativamente a sensibilidade das metodologias moleculares utilizadas para a genotipagem (Ferguson *et al.* 2006; Xiao, 2009).

Quadro IV. Diferenças entre algumas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em quatro regiões do gene SSU rRNA (adaptada e modificada de Xiao *et al.* 1999b).

Espécies/ Genótipos	Localização das mutações no gene SSU rRNA*			
	182-189	273-286	639-656	689-699
<i>C. parvum</i>	AAACTCGA	ATTAA-----A	AAATATTTTGATGAATATT-----TATATAAT	ACTA-----TATATTTTAGT
<i>C. hominis</i>	AAACTCGA	AATTA-----A	AAATATTTTGATGAATATT-----TATATAAT	ACTA-----TTTTTTTTTTAGT
<i>C. meleagridis</i>	AAACCTGA	AATTT-----A	TAATA-TTTGATTAATATT-----TATATAAT	ACTA-----AATTTATTAGT
<i>C. felis</i>	GA-CCCTA	AATAATTTATTT	TAATATTTTTTTTTTAAATATTAATATGTAAG	TTTAAGACTGAATTTTAGTTTTGATA
<i>C. wrairi</i>	AGGCCCGA	ATAAA-----T	TAATATTTTGA-AAATATT-----TATATAAT	ACTA-----TATATTTTAGT
<i>C. baileyi</i>	AGACCCGA	ATTT-----A	CAATACCACG----GTATT-----TATATAAC	ACT-----TATTTAAAGT
Genótipo porco	AAACCTAA	ATTTT-----A	TAATATTTT--T-AATATT-----TATATAAT	ACTA-----TAATTTTATTAGT
Genótipo cão	AAACCTGA	ATTTT-----A	TAATATTT---AACATATT-----TATATAAT	ACTA-----TTTATAGT

*Posições dos nucleótidos nas sequências alinhadas de algumas espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. Nas sequências individuais, as posições variam devido à introdução de *gaps* (traços) nas sequências alinhadas (1.757 par de bases, pb).

1.7.1.2. Locus GP60

O gene *gp15/45/60* (Strong *et al.* 2000) também denominado *Cpgp40/15* (Cevallos *et al.* 2000) codifica um precursor glicoproteico, a GP60. As observações iniciais de Strong *et al.* (2000) referem que este precursor glicoproteico compreende uma proteína constituída por 330 aminoácidos e, estruturalmente, apresenta um peptídeo sinal N-terminal, seguida de uma extensão homopolimérica de resíduos de serina, as quais juntamente com os resíduos de treonina encontram-se O-glicosiladas, com um local único de N-glicosilação, e um peptídeo C-terminal hidrofóbico, o qual

especifica um local de fixação de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI). A GP60 é sintetizada durante os estádios intracelulares do parasita (Cevallos *et al.* 2000; Strong *et al.* 2000; Tzipori & Ward, 2002) e a sua clivagem proteolítica resulta na produção de duas glicoproteínas de superfície, a glicoproteína de 45-kDa (GP45) e a glicoproteína de 15-kDa (GP15), as quais compreendem respectivamente o N- e C-terminal deste precursor (Strong *et al.* 2000; Tzipori & Ward, 2002; Waldron & Power, 2011). A GP45, também denominada glicoproteína de 40-kDa (GP40) (Cevallos *et al.* 2000) está localizada à superfície e na região apical dos estádios invasivos do parasita, enquanto a GP15, o antígeno mais imunodominante em *Cryptosporidium* spp., encontra-se ancorada à membrana dos esporozoítos e dos merozoítos pela molécula GPI (Cevallos *et al.* 2000; Tzipori & Ward, 2002; Waldron & Power, 2011). Ambas as glicoproteínas estão implicadas nos processos de ligação e invasão dos zoítos aos enterócitos (Cevallos *et al.* 2000; Strong *et al.* 2000; Leav *et al.* 2002).

O gene GP60, localizado no cromossoma VI (Leav *et al.* 2002) é um gene de cópia única que não apresenta intrões (Cevallos *et al.* 2000; Strong *et al.* 2000) e constitui actualmente o marcador molecular mais polimórfico identificado no genoma de *Cryptosporidium* spp. (Strong *et al.* 2000; Xiao, 2010; Waldron & Power, 2011). A extremidade 5' do gene, região N-terminal da GP45, apresenta uma sequência hipervariável, semelhante aos microssatélites, nomeadamente repetições em *tandem* dos trinucleótidos que codificam o aminoácido serina: TCA, TCG e/ou TCT (Xiao, 2010; Waldron & Power, 2011). Para além disso, o gene apresenta uma região caracterizada por numerosos polimorfismos de base única, (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) e polimorfismos de um único aminoácido (SAAP, do inglês *single amino acid polymorphism*), os quais contribuem para a elevada natureza polimórfica do locus GP60, sendo mais notável nos isolados *C. hominis* (Strong *et al.* 2000; Leav *et al.* 2002). O gene apresenta também regiões conservadas, nomeadamente uma sequência de cinco aminoácidos localizados na região N-terminal, o local de clivagem do precursor glicoproteico, e o local de ligação da âncora GPI são constantes em todos os isolados (Leav *et al.* 2002).

Os polimorfismos localizados nas regiões não repetitivas do gene permitem classificar *C. hominis* e *C. parvum* em várias famílias de subtipos, e até à data já permitiram a identificação de seis famílias de subtipos de *C. hominis*, às quais é

atribuída a designação I (Ia, Ib, Id-Ig) e 11 de *C. parvum*, representado por II (IIa-III, IIk e III) (Xiao, 2010; Waldron & Power, 2011). Por sua vez, a variação do número e da sequência dos codões que codificam o aminoácido serina já referidos, são utilizados para determinar a variação intra-alélica uma vez que permitem identificar os diversos subtipos de ambas as espécies, *C. hominis* e *C. parvum*, dentro de cada família de subtipo (Strong *et al.* 2000; Leav *et al.* 2002; Alves *et al.* 2003, 2006; Sulaiman *et al.* 2005; Xiao, 2010; Waldron & Power, 2011). No quadro V estão descritas as famílias de subtipo de *C. hominis* e de *C. parvum*, e alguns dos respectivos subtipos.

Quadro V. Nomenclatura e designação das famílias de subtipo e respectivos subtipos de *C. parvum* e de *C. hominis* (adaptada e modificada de Xiao, 2010).

Espécie	Família de subtipo	Codões na região dos microssatélites	Outras repetições (R)	Exemplos de subtipos
<i>C. hominis</i>	Ia	TCA	AA/GGACGGTGGTAAGG	IaA23R4
	Ib	TCA, TCG, TCT	-	IbA10G2; IbA9G2T1
	Id	TCA, TCG	-	IdA16
	Ie	TCA, TCG, TCT	-	IeA11G3T3
	If	TCA, TCG	-	IfA19G1
	Ig	TCA	-	IgA24
<i>C. parvum</i>	IIa	TCA, TCG	ACATCA	IIaA15G2R1; IIaA15G2R2
	IIb	TCA	-	IIbA14
	IIc	TCA, TCG	-	IIcA5G3a; IIcA5G3d
	IId	TCA, TCG	-	IIdA18G1
	IIe	TCA, TCG	-	IIeA12G1
	IIf	TCA	-	IIfA6
	IIg	TCA	-	IIgA9
	IIh	TCA, TCG	-	IIhA7G4
	IIi	TCA	-	IIiA10
	IIk	TCA	-	IIkA14
	III	TCA	-	IIIA18

No que respeita à designação dos subtipos, Sulaiman *et al.* (2005) desenvolveram a nomenclatura actualmente utilizada. Inicialmente é designada a família de subtipo, seguido da designação e do número de repetições dos codões que codificam o aminoácido serina sequencialmente (figura 7). O codão TCA é representado

pela letra A, o codão TCG representado pela letra G e o codão TCT representado pela letra T (Sulaiman *et al.* 2005; Xiao, 2010). Alguns subtipos da família de subtipo IIa de *C. parvum* poderão apresentar uma ou duas repetições da sequência ACATCA imediatamente a seguir às repetições dos codões, as quais são designadas por “R1” e “R2”, respectivamente (Sulaiman *et al.* 2005; Xiao, 2010). Adicionalmente outros subtipos de *C. parvum*, como aqueles relativos às famílias de subtipo IIc, anteriormente designada Ic (Alves *et al.* 2003), e IId podem divergir da sequência original e, nesse caso enquanto a sequência original é seguida da letra “a”, os subtipos que divergem desta são enunciados por outra extensão alfabética (Sulaiman *et al.* 2005; Xiao, 2010). Relativamente à família de subtipo Ia de *C. hominis* a designação dos subtipos inclui ainda a identificação do número de cópias de uma sequência repetitiva de 15 pb, 5'-AA/GGACGGTGGTAAGG-3', localizada a jusante das repetições dos trinucleótidos, e a qual é representada pela letra “R” (Xiao, 2010).

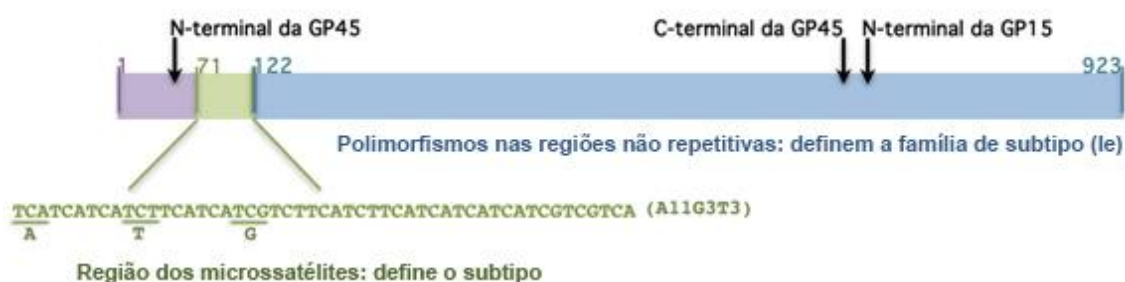


Figura 7. Representação esquemática do gene GP60. Tem por base a sequência AY738184 (IeA11G3T3) depositada no *GenBank*. A região dos microssatélites está representada a verde, cujo número e sequência dos codões TCA, TCG e TCT permitem identificar o subtipo dentro de cada família de subtipo. A família de subtipo é identificada de acordo com os polimorfismos descritos nas regiões não repetitivas (destacadas a roxo e a azul). Os números indicam a posição dos nucleótidos ao longo da sequência nucleotídica. As setas indicam o local N- e C-terminal das glicoproteínas de superfície resultantes da clivagem do precursor glicoproteico. GP: glicoproteína. Esquema da autora.

O vasto polimorfismo do *locus gp15/45/60* sugere um importante papel no estabelecimento da relação entre o genótipo e o fenótipo do parasita (Strong *et al.* 2000) o qual é consistente com as glicoproteínas codificadas, uma vez que compreendem determinantes de virulência localizadas à superfície do parasita que estão sob pressão contínua do sistema imunológico (Leav *et al.* 2002; Tzipori & Ward, 2002).

1.7.2. Espécies de *Cryptosporidium* prevalentes no Homem

Das várias espécies comumente descritas nos humanos, *C. parvum* e *C. hominis* compreendem as mais frequentemente implicadas, sendo contudo, notável a distinta distribuição geográfica a nível mundial relativamente a ambas as espécies (Cacciò *et al.* 2005). *C. parvum* é a espécie mais prevalente na Europa e é responsável em média por 57% das infecções, enquanto *C. hominis* parece ser a espécie mais prevalente na América, na África e na Austrália, sendo responsável em média por cerca de 62% das infecções (Cacciò *et al.* 2005).

Mais concretamente, estudos conduzidos no Reino Unido revelaram que os surtos esporádicos são maioritariamente causados por *C. parvum* (McLauchlin *et al.* 1999, 2000), tendo sido corroborado mais recentemente, num estudo realizado por Leoni *et al.* (2006), a dominância da espécie *C. parvum* comparativamente a *C. hominis* neste país. Outros países europeus (Irlanda do Norte, Portugal, França, Suíça) e a Nova Zelândia revelam à semelhança do Reino Unido, um maior predomínio de indivíduos infectados por *C. parvum* seguido de *C. hominis* (Morgan *et al.* 2000; Lowery *et al.* 2001; Guyot *et al.* 2001; Alves *et al.* 2001; 2003; Learmonth *et al.* 2004; Matos *et al.* 2004). Noutras áreas industrializadas, como os EUA, o Canadá, a Austrália e o Japão, a epidemiologia da criptosporidiose destaca-se das áreas geográficas acima mencionadas, verificando-se que o agente etiológico frequentemente implicado nos casos de criptosporidiose humana diz respeito à espécie *C. hominis* (Pieniazek *et al.* 1999; O'Brien *et al.* 2008; Jex *et al.* 2008b; Xiao & Feng, 2008). Curiosamente, no Kuwait, uma região amplamente urbanizada, *C. parvum* surge como a espécie dominante (Sulaiman *et al.* 2005). Relativamente aos países em desenvolvimento, a dispersão das espécies de *Cryptosporidium* é distinta da descrita na maioria dos países desenvolvidos uma vez que *C. hominis* é a espécie mais frequente nos isolados humanos, verificando-se que as infecções causadas por *C. parvum* são pouco frequentes (Xiao & Feng, 2008). A dominância de *C. hominis* relativamente a *C. parvum* foi descrita nas populações residentes no Peru, Malawi, África do Sul e Quênia, tendo sido demonstrado em todas as situações, que mais de 50% dos indivíduos revelaram estar infectados por *C. hominis* (Xiao *et al.* 2001a; Leav *et al.* 2002; Gatei *et al.* 2003; Peng *et al.* 2003; Cama *et al.* 2007).

A distribuição geográfica de ambas as espécies revela uma complexidade acrescida uma vez que vários estudos sugerem diferenças significativas dentro do próprio país. No Reino Unido, embora *C. parvum* seja a espécie dominante, na região a sul da Tamisa, *C. hominis* é responsável por um maior número de infecções comparativamente ao primeiro (McLauchlin *et al.* 1999, 2000). Na Nova Zelândia, de forma semelhante, verifica-se que a região metropolitana de Wellington regista um maior número de infecções atribuídas a *C. hominis*, enquanto nas regiões rurais, *C. parvum* é a espécie predominante (Learmonth *et al.* 2004). O maior número de infecções por *C. hominis* nas áreas urbanas, e por *C. parvum* nas áreas rurais, parece reflectir não somente a distribuição das áreas rurais e dos animais no país, mas também actividades relacionadas com a pecuária intensiva (McLauchlin *et al.* 1999; Learmonth *et al.* 2004; Xiao & Feng, 2008). Concomitantemente com as diferenças a nível geográfico têm sido descritas diferenças na distribuição a nível sazonal. No Reino Unido e Nova Zelândia, os casos de criptosporidiose humana atribuídos a *C. parvum* foram maioritariamente descritos na primavera, o que parece reflectir as práticas agrícolas próprias da época, como o nascimento de animais, e o escoamento agrícola devido a chuvas primaveris, enquanto no outono, *C. hominis* foi o principal responsável pelas infecções, sugerindo que este pico poderá ser o resultado do aumento de actividades recreativas aquáticas ou a realização de viagens para o estrangeiro no início desta estação (McLauchlin *et al.* 2000; Learmonth *et al.* 2004; Xiao & Feng, 2008).

No que refere a outras espécies já descritas nos humanos, particularmente *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*, a distribuição na população em geral, contrariamente a *C. parvum* e *C. hominis*, não é equitativa entre os indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, verificando-se que estes últimos apresentam um maior predomínio de infecções por estas espécies (Xiao *et al.* 2000a; Xiao & Feng, 2008). De entre estas espécies, em Portugal os indivíduos imunocomprometidos seropositivos para VIH encontram-se maioritariamente infectados por *C. meleagridis* e *C. felis* (Alves *et al.* 2001, 2003; Matos *et al.* 2004) tendo sido descritas situações idênticas noutros países europeus como a Suíça e a França (Morgan *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2001). Também nos países em desenvolvimento, as crianças e os indivíduos seropositivos para VIH apresentam uma prevalência mais elevada de *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* e *C. muris*, verificando-se que no Peru e Tailândia as três primeiras são responsáveis por

cerca de 15 a 20% das infecções nestes grupos de risco (Xiao & Feng, 2008). As crianças seronegativas para VIH e os adultos seropositivos para VIH residentes no Peru revelaram estar infectados por *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* (Xiao *et al.* 2001a; Cama *et al.* 2007). Por sua vez, no Quênia dois isolados de indivíduos seropositivos para VIH apresentaram infecção por *C. meleagridis* e *C. muris* (Gatei *et al.* 2003), enquanto na Jamaica foram identificadas as espécies *C. canis* e *C. felis* também nesta população (Gatei *et al.* 2008).

1.7.3. Espécies de *Cryptosporidium* prevalentes no gado doméstico

Os estudos recentes de caracterização molecular no gado bovino têm demonstrado que as infecções são geralmente atribuídas a quatro espécies, *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni* (Santín *et al.* 2004, 2008, Fayer *et al.* 2006, 2007; Geurden *et al.* 2007; Feng *et al.* 2007). Um estudo longitudinal realizado nos EUA demonstrou que a infecção por cada uma destas espécies está relacionada com a idade dos bovinos ao verificar que enquanto *C. parvum* foi responsável por cerca de 85% (138/161) das infecções em vitelos não desmamados, em vitelos desmamados foi apenas responsável por 1% (1/117) das infecções (Santín *et al.* 2004). Nos bovinos mais adultos, com 12 a 24 meses de idade, *C. parvum* foi responsável por 6% (4/68) das infecções (Fayer *et al.* 2006), tendo sido descrita uma percentagem de infecção idêntica nos bovinos com mais de dois anos de idade (6%; 2/31) (Fayer *et al.* 2007). A espécie *C. bovis* foi identificada somente em 9% (14/161) dos vitelos não desmamados, contudo verificou-se uma subida abrupta da infecção por esta espécie em vitelos desmamados, tendo sido registada uma prevalência de infecção de 55% (65/117) (Santín *et al.* 2004). Nos bovinos mais adultos, a prevalência de *C. bovis* diminuiu gradualmente verificando-se que nos bovinos até dois anos de idade esta espécie apresentou uma prevalência de 35% (24/68), enquanto nos bovinos com mais de dois anos foi registada uma prevalência de 29% (9/31) (Fayer *et al.* 2006, 2007). No que respeita à espécie *C. ryanae*, nos vitelos não desmamados e desmamados, esta espécie foi identificada respectivamente em 5% (8/161) e 31% (36/117) das infecções, enquanto em bovinos mais adultos foi identificado apenas naqueles com 12 a 17 meses de idade, com uma prevalência de 15% (10/68) (Santín *et al.* 2004; Fayer *et al.* 2006, 2007). Relativamente

a *C. andersoni*, nos vitelos não desmamados esta espécie foi identificada somente em 1% (1/161) dos isolados positivos, contudo a prevalência desta espécie acompanhou a idade dos bovinos, e em vitelos desmamados, e naqueles com até dois e mais de dois anos de idade as prevalências foram respectivamente de 13% (15/117), 43% (29/68) e 65% (20/31) (Santín *et al.* 2004; Fayer *et al.* 2006, 2007). Um outro estudo longitudinal mais recente realizado nos EUA corrobora as conclusões do estudo anterior ao verificar que a prevalência de cada uma das espécies acima mencionadas correlaciona-se com a idade dos bovinos, sendo a distribuição destas espécies idêntica à descrita anteriormente (Santín *et al.* 2008). À semelhança destes estudos, na Bélgica, Geurden *et al.* (2007) identificaram *C. parvum* como a espécie mais prevalente em vitelos não desmamados, enquanto *C. bovis* foi identificado em vitelos com mais de um mês de idade, corroborando assim a sua maior prevalência em vitelos mais adultos. No Reino Unido, Brook *et al.* (2009) identificaram em vitelos com idade média de 26 dias três espécies, verificando-se que a mais prevalente foi *C. parvum* (93%; 50/54), seguido de *C. bovis* (6%; 3/54) e *C. ryanae* (2%; 1/54), estas últimas identificadas em vitelos com mais de 21 dias de idade. Contrariamente a estes estudos, Feng *et al.* (2007) sugerem que pode não existir uma distribuição das espécies consoante a idade dos bovinos ao identificarem *C. bovis* em vitelos com duas a três semanas de idade dos EUA e da China e em animais mais adultos, enquanto *C. ryanae* foi identificado também em vitelos não desmamados e desmamados e em bovinos adultos dos EUA e da China. Outras espécies e genótipos mais raramente descritos no gado bovino dizem a respeito a *C. suis*, identificado num vitelo dos EUA e da Bélgica (Fayer *et al.* 2006; Geurden *et al.* 2007), mas também *C. hominis*, *C. felis*, *C. canis* e o genótipo *Cryptosporidium* porco II, os quais têm sido descritos devido a infecções experimentais ou encontrados ocasionalmente no gado bovino (Santín *et al.* 2008).

Nos pequenos ruminantes, nomeadamente nos ovinos têm sido descritas várias espécies e genótipos. Na Austrália, Ryan *et al.* (2005) descreveram diversos genótipos e espécies, de entre os quais identificaram o genótipo cervo como o mais prevalente, seguido da espécie *C. bovis*. À semelhança deste estudo, nos EUA, Santín *et al.* (2007) verificaram que o genótipo cervo foi também o mais prevalente, quer em cordeiros quer em ovelhas. Contudo, as restantes espécies identificadas em ambos os estudos diferem entre si. Na Austrália, para além das espécies já mencionadas foram identificadas em

menor proporção *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. suis*, o genótipo *Cryptosporidium* porco II e o genótipo marsupial, enquanto nos EUA foram identificados *C. parvum* e *C. bovis-like* (Ryan *et al.* 2005; Santín *et al.* 2007). Contrariamente a estes estudos, no Reino Unido, em Espanha e em Portugal, *C. parvum* foi a única espécie identificada em ovinos e caprinos (McLauchlin *et al.* 2000; Alves *et al.* 2006; Quílez *et al.* 2008).

Nos suínos, *C. suis* e o genótipo *Cryptosporidium* porco II constituem a espécie e o genótipo predominantemente descritos em diversas áreas geográficas (Xiao *et al.* 2006; Suárez-Luengas *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2008). Na Austrália, o genótipo *Cryptosporidium* porco II foi o mais prevalente tendo sido descrito apenas em leitões desmamados, seguido de *C. suis* o qual foi identificado em leitões não desmamados e desmamados (Johnson *et al.* 2008). Em Espanha e na Irlanda, à semelhança deste estudo também foram identificados *C. suis* e o genótipo *Cryptosporidium* porco II, contudo não se verificou uma associação entre a idade do suíno e a espécie/genótipo envolvido na infecção (Xiao *et al.* 2006), contrariamente ao que foi descrito no gado bovino (Santín *et al.* 2004, 2008).

1.7.4. Famílias de subtipo e subtipos de *C. parvum* e de *C. hominis*

A família de subtipo IIa de *C. parvum*, frequentemente implicada na criptosporidiose dos vitelos, tem sido descrita com regularidade nos humanos dos países desenvolvidos que residem em áreas rurais (Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010). Mais concretamente, o subtipo IIaA15G2R1 de *C. parvum* tem sido frequentemente descrito nos bovinos da Holanda, verificando-se que este subtipo é também o predominante nos humanos deste país (Wielinga *et al.* 2008). Em Portugal, à semelhança do estudo anterior, o subtipo IIaA15G2R1 da família IIa de *C. parvum*, revelou ser o mais comum, quer entre humanos, quer entre bovinos e ruminantes do zoo (Alves *et al.* 2003; 2006). Também no Kuwait, o subtipo IIaA15G2R1 da família IIa de *C. parvum* foi o predominante nos humanos, tendo ainda sido descrito o subtipo IIaA15G1R1 em apenas dois isolados desta população (Sulaiman *et al.* 2005). Comparativamente a outras áreas desenvolvidas, em Wisconsin, EUA, os subtipos predominantes da família IIa de *C. parvum* nos humanos, IIaA15G2R2 e IIaA15G2R1, já foram previamente descritos em bovinos de áreas geograficamente próximas, nomeadamente de Michigan e de Ontario,

Canadá (Feltus *et al.* 2006; Trotz-Williams *et al.* 2006; Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010). Por sua vez na Austrália, dos vários subtipos da família de subtipo IIa de *C. parvum*, o subtipo IIaA18G3R1 foi o mais frequente na população humana (O'Brien *et al.* 2008; Jex *et al.* 2008b), o qual foi também predominante em bovinos da mesma região (O'Brien *et al.* 2008). Para além destes, o subtipo IIaA16G1R1 de *C. parvum*, cuja distribuição parece estar sobretudo restrita aos bovinos da Hungria, Sérvia e Montenegro e Eslovénia, já foi também previamente caracterizado em humanos deste último país (Misic & Abe, 2007; Plutzer & Karanis, 2007; Soba & Logar, 2008).

A família de subtipo IId de *C. parvum*, embora descrita menos frequentemente, parece ser responsável por algumas infecções zoonóticas, principalmente na Europa (Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010). Nomeadamente em Portugal, já foram caracterizados quatro subtipos da família IId em indivíduos seropositivos para VIH, de entre os quais, IIdA17G1 e IIdA21G1 foram simultaneamente descritos em vitelos e numa ovelha, respectivamente (Alves *et al.* 2006). Na Holanda, por sua vez, os subtipos IIdA15G1, IIdA16G1 e IIdA18G1 embora identificados em humanos, nenhum deles foi identificado nos bovinos deste país (Wielinga *et al.* 2008). No Kuwait, curiosamente, a família de subtipo IId de *C. parvum* foi caracterizada em cerca de metade das crianças infectadas, tendo sido descritos dois subtipos, IIdA20G1 e IIdA18G1 (Sulaiman *et al.* 2005). Contudo, as crianças deste país têm pouco contacto com animais e, como tal, neste caso, os subtipos descritos parecem ter origem antroponótica (Sulaiman *et al.* 2005; Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010). Por outro lado, nos EUA e no Canadá, contrariamente ao descrito nestes estudos, os subtipos da família de subtipo IId de *C. parvum* nunca foram descritos nos humanos ou nos animais destas regiões (Feltus *et al.* 2006; Trotz-Williams *et al.* 2006; Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010), o que reflecte as diferenças do papel da transmissão zoonótica de *C. parvum* entre as diferentes áreas geográficas (Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010).

Nem todas as infecções causadas por subtipos de *C. parvum* em humanos resultam de infecções zoonóticas (Alves *et al.* 2003; Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010) e, nomeadamente em Portugal as famílias de subtipo IIb e IIc de *C. parvum*, embora descritos em humanos nunca foram caracterizados nos animais deste país (Alves *et al.* 2003, 2006). De forma semelhante, estudos posteriores nos bovinos e nos humanos da Holanda, da Eslovénia e da Austrália demonstraram que a família de subtipo IIc de *C.*

parvum apenas foi caracterizada na população humana, o que suporta a sua natureza antroponótica (O'Brien *et al.* 2008; Soba & Logar, 2008; Wielinga *et al.* 2008). Adicionalmente, nas áreas urbanas dos EUA, enquanto a família de subtipo IIa raramente está presente nos humanos, a família IIc, cuja transmissão é antroponótica é responsável pela maioria das infecções nos humanos que residem nestas áreas (Xiao *et al.* 2004; Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010).

Contrariamente aos países desenvolvidos, a transmissão de *C. parvum* nos países em desenvolvimento parece ser sobretudo de origem antroponótica, uma vez que a família de subtipo IIa de *C. parvum* raramente é descrita nestes indivíduos (Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010). Na África do Sul, a família de subtipo IIc de *C. parvum* foi a única família desta espécie caracterizada nas crianças desta região (Leav *et al.* 2002). Na região de Malawi foram identificadas duas famílias de subtipo de *C. parvum*, IIc e Iie (Peng *et al.* 2003), esta última descrita também apenas nos humanos, sugerindo origem antroponótica (Xiao, 2010; Xiao & Feng, 2008). Resultados idênticos foram obtidos em indivíduos infectados por VIH residentes no Peru e na Jamaica, onde apenas foi identificada a família de subtipo IIc de *C. parvum* (Cama *et al.* 2007; Gatei *et al.* 2008). A transmissão antroponótica da família de subtipo IIc de *C. parvum* nos países em desenvolvimento está de acordo com o predomínio de *C. hominis* nestes países e com a ausência desta mesma família nos ruminantes dos países desenvolvidos (Xiao, 2010).

Relativamente à espécie *C. hominis*, os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento apresentam diferenças na proporção de infecções atribuídas a este agente etiológico, sendo notável as diferenças a nível epidemiológico desta espécie em ambos os países desenvolvidos e em desenvolvimento (Xiao, 2010). Os países desenvolvidos apresentam uma diversidade genética de *C. hominis* relativamente baixa (Xiao, 2010), verificando-se que o subtipo IbA10G2 da família de subtipo Ib de *C. hominis* tem sido descrito frequentemente na população humana de Portugal, da Holanda, do Reino Unido e da Austrália (Alves *et al.* 2003, 2006; Chalmers *et al.* 2008; O'Brien *et al.* 2008; Jex *et al.* 2008b; Wielinga *et al.* 2008). Nalgumas regiões da Austrália, para além do subtipo IbA10G2, o subtipo IbA9G3 também é habitualmente identificado (Jex *et al.* 2008b), enquanto os subtipos IbA18G1, IbA5G2T3 e IbA9G2T1 são apenas descritos ocasionalmente (O'Brien *et al.* 2008; Xiao, 2010). A presença de

outros subtipos para além do IbA10G2 nos humanos do Reino Unido parece estar relacionada com a realização de viagens recentes realizadas fora da Europa (Chalmers *et al.* 2008). No Kuwait os subtipos IbA10G2 e IbA9G3 foram caracterizados num isolado cada (Sulaiman *et al.* 2005).

Os países em desenvolvimento apresentam uma complexidade acrescida relativamente às infecções causadas por *C. hominis*, o que é reflectido pela ocorrência de várias famílias de subtipo e múltiplos subtipos, particularmente nas famílias Ia e Id (Xiao, 2010). As famílias de subtipo Ia, Ib, Id e Ie são frequentemente descritas nos países em desenvolvimento (Xiao, 2010), tendo sido identificadas nas populações do Peru, da África do Sul, da Nigéria e do Malawi (Leav *et al.* 2002; Peng *et al.* 2003; Cama *et al.* 2007; Molloy *et al.* 2010). Na Nigéria e no Peru parece existir uma maior diversidade genética nas famílias de subtipo Ia e Id de *C. hominis*, tendo sido descritos seis subtipos da família Ia e dois da família Id na Nigéria (Molloy *et al.* 2010), enquanto no Peru foram identificados nove subtipos da família Ia e quatro da família Id (Cama *et al.* 2007). Curiosamente o subtipo IbA13G3, descrito muito raramente, na Nigéria foi o mais prevalente (Molloy *et al.* 2010), enquanto no Peru, o subtipo mais comum foi o IbA10G2, tendo ainda sido identificado o subtipo raro IbA13G3 em quatro isolados (Cama *et al.* 2007). À semelhança do estudo anterior, na Jamaica o subtipo IbA10G2 foi dominante (Gatei *et al.* 2008). A distribuição da família de subtipo Ie nas áreas endémicas, à semelhança das famílias de subtipo anteriores não é uniforme, uma vez que enquanto o subtipo IeA11G3T3 é descrito mais frequentemente, tendo sido caracterizado nos humanos do Peru e da Nigéria (Cama *et al.* 2007; Molloy *et al.* 2010), na Jamaica e na China o subtipo IeA12G3T3 foi o único desta família de subtipo, o qual é descrito mais raramente (Gatei *et al.* 2008; Xiao, 2010). A elevada heterogeneidade de famílias de subtipo e subtipos da espécie *C. hominis* nos países em desenvolvimento é um importante indicador da transmissão estável e intensa da criptosporidiose nestas áreas (Xiao, 2010).

Objectivos gerais

Apesar dos inúmeros estudos que têm vindo a ser publicados, os protozoários do género *Cryptosporidium* apresentam determinadas peculiaridades que incitam as diversas investigações epidemiológicas a nível mundial. Na Roménia, os estudos relativamente a estes parasitas revelam-se ainda bastante escassos e, verifica-se que até à data, todos os estudos de caracterização molecular dos protozoários do género *Cryptosporidium* já realizados neste país incidiram apenas em animais, razão que motivou este estudo, uma vez que este trabalho incluiu para além da população animal, também a população humana. Portanto, e tendo em conta os estudos já realizados, a realização do presente trabalho teve como principais objectivos avaliar a diversidade de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* que infectam os humanos e os animais do distrito de Timis, Roménia, e caracterizar os subtipos de *C. parvum* e de *C. hominis*, de modo a perceber quais os principais reservatórios e as formas de transmissão responsáveis pelos surtos de criptosporidiose nesta região.

Objectivos específicos:

- a) Determinação da frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. nos hospedeiros humanos e animais em estudo.
- b) Identificação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* responsáveis pela infecção nos hospedeiros humanos através da caracterização molecular dos isolados.
- c) Identificação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* responsáveis pela infecção nos hospedeiros animais através da caracterização molecular dos isolados.
- d) Caracterização intra-molecular dos isolados de *C. parvum* e/ou de *C. hominis* na população humana e animal.
- e) Comparação entre a constituição genética da população de *Cryptosporidium* spp. caracterizada nas populações humana e animal de Portugal e da Roménia, e identificação dos reservatórios e vias de transmissão presentes em ambos os países.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. População do estudo

2.1.1. População humana

O diagnóstico de criptosporidiose foi realizado num total de 11 amostras fecais de 11 doentes, recolhidas em Julho do ano 2008 no distrito de Timis, Roménia. A população alvo do estudo foram crianças até 12 anos de idade, não tendo sido fornecida a idade precisa de cada uma delas, e na altura da colheita das amostras fecais todas elas apresentavam sintomatologia gastrointestinal. As amostras fecais recolhidas eram diarreicas ou pastosas, tendo sido conservadas em 2,5% de dicromato de potássio, em recipientes adequados, a 4°C. Todas as amostras fecais recolhidas foram submetidas a técnicas parasitológicas e moleculares para identificação dos isolados positivos. A caracterização molecular e intra-molecular foi realizada posteriormente em todos os isolados observados ao microscópio, bem como naqueles identificados por técnicas de biologia molecular.

2.1.2. População animal

Na população animal, o diagnóstico de criptosporidiose foi realizado num total de 37 amostras fecais de 37 animais, recolhidas também em Julho do ano 2008 no distrito de Timis, Roménia. De entre estas amostras fecais, oito eram de origem suína e 29 de origem bovina. Relativamente à idade dos animais, os suínos submetidos a este estudo tinham nove semanas de vida, contudo, no que respeita aos bovinos não foi possível aceder aos seus dados demográficos exactos, sabíamos no entanto, que no geral, estes tinham até dois meses de idade. No período da colheita, todos os animais apresentavam diversos sintomas gastrointestinais, tendo-se verificado que a diarreia foi o sintoma comum a todos eles. As amostras fecais eram pastosas, tendo sido recolhidas directamente do recto dos animais e conservadas em 2,5% de dicromato de potássio, em recipientes adequados, a 4°C. Todas as amostras fecais recolhidas foram submetidas a técnicas parasitológicas e moleculares para identificação dos isolados positivos. A caracterização molecular e intra-molecular foi realizada posteriormente em todos os isolados observados ao microscópio, bem como naqueles identificados por técnicas de biologia molecular.

2.2. Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico de infecção por *Cryptosporidium* spp. foi realizado em todas as amostras fecais de origem humana e animal, e consistiu na observação microscópica de oocistos nos esfregaços fecais directo e dos sedimentos das amostras, após coloração dos mesmos. Para obtenção dos esfregaços fecais dos sedimentos todas as amostras, como descrito adiante, foram previamente submetidas a um processo de concentração.

2.2.1. Preparação do esfregaço fecal directo

Por cada amostra fecal foi realizado um esfregaço fecal directo. Inicialmente homogeneizou-se uma pequena quantidade de fezes com uma zaragatoa ou uma pipeta de Pasteur, conforme a consistência da amostra e, seguidamente, fez-se um esfregaço numa das extremidades da lâmina, e deixou-se secar à temperatura ambiente para posterior coloração.

2.2.2. Concentração das amostras fecais

A concentração das amostras fecais foi realizada segundo o método de sedimentação difásica de Ritchie modificado, modificado e adaptado de Casemore *et al.* (1985), cuja abordagem permite concentrar os oocistos através da sedimentação por centrifugação. Num tubo de centrífuga de 10 ml homogeneizou-se cerca de 0,5 ml de amostra ou o equivalente de amostra sólida em 3 ml de água desionizada e seguidamente adicionaram-se 3 ml de éter (Merck, Alemanha). Os tubos foram cuidadosamente selados e a solução foi agitada vigorosamente durante cerca de 30 a 40 segundos no vórtex. A solução foi posteriormente filtrada com a ajuda de um funil em duas camadas de gaze para um segundo tubo de centrífuga de 10 ml e perfez-se o volume final com água desionizada. Os tubos contendo o filtrado foram selados com parafilme e centrifugados durante cinco minutos a $400 \times g$ na centrífuga Kubota 4000 (Kubota, Japão).

Seguidamente, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, as fases etérea e de detritos foram descartadas enquanto a fase que ficou entre o éter e o sedimento foi

transferida para um terceiro tubo de centrífuga de 10 ml. O primeiro sedimento resultante, que geralmente é guardado para posterior pesquisa de ovos e quistos de outros parasitas, neste estudo não teve esse propósito, tendo sido devidamente acondicionado e armazenado a 4°C até à sua posterior utilização. Perfez-se novamente o volume da última fase transferida com água desionizada e centrifugou-se durante 10 minutos a $4.100 \times g$. O sobrenadante resultante foi desprezado tendo o cuidado de deixar o suficiente para ressuspender bem o sedimento. Por fim efectuaram-se dois esfregaços deste último sedimento na lâmina onde já tinha sido efectuado previamente o esfregaço fecal directo. Os esfregaços secaram à temperatura ambiente e o remanescente foi conservado a 4°C.

2.2.3. Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

A visualização microscópica dos oocistos nos esfregaços fecais foi realizada após coloração diferencial das lâminas pelo método de Ziehl-Neelsen modificado segundo Casemore *et al.* (1985). Nesta coloração as paredes dos oocistos aparecem refringentes a rodear a estrutura interna, a qual cora de rosa a vermelho brilhante contra um fundo azul, e cuja morfologia varia entre uma massa amorfa a estruturas esporuladas múltiplas em forma crescente (Casemore *et al.* 1985). Uma vez bem secos, os esfregaços fecais foram fixados em metanol (Panreac Química S.A.U., Espanha) durante um minuto. As lâminas foram posteriormente mergulhadas em fucsina básica fenicada (Deltalab, Espanha) durante 10 minutos e seguidamente lavadas com água corrente e descoradas com álcool clorídrico a 1% (etanol absoluto [Panreac Química S.A.U., Espanha]; ácido clorídrico [HCl, Sigma-Aldrich, EUA]) até à eliminação total do corante em excesso. As lâminas foram novamente lavadas com água e seguidamente mergulhadas em azul-de-metileno (Deltalab, Espanha) durante 30 segundos. Finalmente passaram-se as lâminas por água, deixaram-se secar à temperatura ambiente e, posteriormente à sua montagem em meio entellan (Merck, Alemanha) foram observadas ao microscópio óptico.

2.2.4. Observação microscópica

Por cada amostra fecal foram observados três esfregaços, um esfregaço directo e dois concentrados, tendo sido consideradas positivas as amostras onde no conjunto dos três esfregaços foram contabilizados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em número igual ou superior a dois. A pesquisa dos oocistos nos esfregaços fecais foi realizada no microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Japão), utilizando para o efeito a ocular $\times 10$ e a objectiva de $\times 20$. Para além desta, recorreu-se também às objectivas de $\times 40$ e de imersão para confirmação da presença dos oocistos nos respectivos esfregaços, e melhor visualização da sua estrutura interna. Nos esfregaços fecais cuja detecção de oocistos foi positiva, a carga parasitária das fezes foi estimada quantitativamente através da determinação do número médio de oocistos observados, com a ampliação de $\times 200$, em 20 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente nos esfregaços directos. No quadro VI encontram-se discriminados os quatro níveis de carga parasitária em função do número de oocistos observados por campo microscópico.

Quadro VI. Quantificação da carga parasitária nas amostras fecais positivas para *Cryptosporidium* spp.

Carga Parasitária	N.º de oocistos/campo*
+	1 a 5
++	6 a 10
+++	11 a 15
++++	>15

* Cálculo estimado com a ampliação de $\times 200$ (ocular $\times 10$ e objectiva $\times 20$).

2.3. Extracção de DNA genómico de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

2.3.1. Preparação dos oocistos para extracção de DNA

Todas as técnicas moleculares empregues neste estudo foram realizadas apenas nos sedimentos das amostras, os quais foram obtidos previamente durante o processo de concentração das amostras pelo método de sedimentação difásica de Ritchie modificado (ver “2.2.2. Concentração das amostras fecais”). Para o efeito, o primeiro e o segundo sedimentos de cada amostra foram homogeneizados num único microtubo, tendo sido armazenados a -20°C até posterior extracção do DNA genómico de *Cryptosporidium* spp.. Esta abordagem tem sido amplamente utilizada uma vez que aumenta a sensibilidade de detecção do parasita ao concentrar o maior número possível de oocistos presentes nas amostras fecais.

2.3.2. Método Mini-BeadBeater/Sílica

Neste estudo, o DNA genómico dos oocistos foi extraído pelo método Mini-BeadBeater/Sílica adaptado de Boom *et al.* (1990) e Patel *et al.* (1998). O princípio desta metodologia envolve quatro etapas principais, nomeadamente a lise mecânica dos oocistos seguida da adsorção do DNA a partículas de sílica activada, lavagem com tampão e solventes orgânicos, e posterior eluição do DNA em água desionizada estéril. Inicialmente, pipetaram-se 200 μl da suspensão dos oocistos concentrados para um microtubo de 1,5 ml e adicionaram-se 900 μl de tampão de lise (7 M tiocianato de guanidina [Calbiochem, EUA e Canadá]; 50 mM Tris-HCl [pH 6.4] [Tris, Calbiochem, EUA e Canadá; HCl, Sigma-Aldrich, EUA]; 25 mM EDTA [pH 8.0] [Merck, Alemanha]; Triton X-100 1,5% v/v [Serva, Alemanha]), 60 μl de álcool isoamílico (Merck, Alemanha) e 0,3 gramas de esferas de zircónio com 0,5 mm de diâmetro (Biospec Products, Inc). A solução foi agitada à velocidade de 2.800 oscilações/minuto durante dois minutos no Mini-BeadBeater (Biospec Products, Howard Industries) e, seguidamente, foi efectuado um *short spin* durante 15 segundos a $23.100 \times g$ na microcentrífuga Kubota 3300 (Kubota, Japão) para sedimentação dos detritos fecais insolúveis e das partículas de zircónio. O sobrenadante foi posteriormente transferido para um segundo microtubo de 1,5 ml e, seguidamente, adicionou-se 40 μl de uma

suspensão aquosa de sílica activada (1% [pH 2.0]) (Sigma-Aldrich, EUA). A sílica encontra-se carregada positivamente a pH baixo, o que potencia a sua ligação ao DNA.

A solução foi agitada vigorosamente, e incubou à temperatura ambiente sob agitação a velocidade moderada e constante durante 60 minutos num agitador rotativo com disco (Fröbel Labortechnik GmbH). Seguidamente a solução foi centrifugada durante 15 segundos a $23.100 \times g$ de forma a ocorrer a sedimentação da sílica com o DNA adsorvido, e o sobrenadante foi desprezado vertendo directamente o microtubo. O sedimento foi posteriormente lavado por centrifugação duas vezes com 200 μ l de tampão de lavagem (7 M tiocianato de guanidina [Calbiochem, EUA e Canadá], 50 mM Tris-HCl [pH 6.4] [Tris, Calbiochem, EUA e Canadá; HCl, Sigma-Aldrich, EUA]), uma vez com 200 μ l de etanol a 80% a -20°C (Panreac Quimica, S.A.U., Espanha) e uma vez com 200 μ l de acetona absoluta (Panreac Quimica, S.A., Espanha). Cada lavagem consistiu na ressuspensão da sílica no tampão ou solvente apropriados e, entre cada lavagem foi realizada uma centrifugação durante 15 segundos a $23.100 \times g$ seguida da rejeição do sobrenadante.

Após a última centrifugação, a acetona foi desprezada e o sedimento incubou num bloco de aquecimento para microtubos (Bibby Sterilin Ltd) a 55°C até à evaporação completa deste solvente. Por fim ressuspendeu-se a sílica em 50 μ l de água desionizada estéril e a solução incubou a 55°C durante cinco minutos de forma a facilitar a eluição do DNA. A sílica foi sedimentada por centrifugação durante dois minutos a $23.100 \times g$ e o sobrenadante contendo o DNA dissolvido foi recolhido para um microtubo de 1,5 ml estéril e conservado a -20°C .

2.4. Diagnóstico e caracterização dos isolados de *Cryptosporidium* spp. por métodos moleculares

Atendendo ao facto das metodologias microscópicas carecerem de alguma sensibilidade e especificidade, neste estudo, todas as amostras fecais foram submetidas ao diagnóstico molecular através da amplificação sequencial de dois *loci*, SSU rRNA e GP60, com o propósito de nos certificarmos da negatividade das amostras para as quais não se obtiveram quaisquer resultados positivos ao diagnóstico parasitológico, ou eventualmente, pela amplificação por um daqueles marcadores moleculares. No entanto, para além do diagnóstico de infecção por *Cryptosporidium* spp., a caracterização molecular dos isolados positivos tem-se revelado fundamental para uma melhor compreensão da epidemiologia destes protozoários. Neste sentido, procedeu-se também à caracterização genética, por determinação da sequência nucleotídica de ambos os *loci*, a SSU rRNA, um marcador molecular ideal para estudos de genotipagem, uma vez que tem permitido identificar as espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* envolvidos na infecção, e a GP60, um marcador molecular ideal para estudos de subgenotipagem uma vez que apresenta um elevado grau de polimorfismo de sequência que nos tem possibilitado a determinação de variabilidade intra-específica nos isolados de *C. hominis* e de *C. parvum*.

2.4.1. Locus SSU rRNA

O diagnóstico molecular com o *locus* SSU rRNA, e a sua subsequente caracterização genética, foi realizado através da amplificação de um fragmento deste gene por um processo de *nested*-PCR, seguida da determinação das sequências nucleotídicas de todos os fragmentos amplificados. As sequências-alvo deste gene são muito polimórficas, e têm revelado variabilidade suficiente para identificar eficazmente as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* responsáveis pela infecção (Xiao *et al.* 1999a, 1999b).

2.4.1.1. Amplificação do *locus* SSU rRNA por *nested*-PCR

A *nested*-PCR compreende uma das muitas abordagens da técnica PCR e consiste, essencialmente na realização de duas reacções de amplificação consecutivas, utilizando para o efeito dois pares de oligonucleótidos iniciadores distintos. A primeira reacção de amplificação emprega o par de oligonucleótidos iniciadores CrySSU1 e CrySSU2, os quais amplificam um fragmento relativamente grande que contém a sequência-alvo, neste caso um fragmento polimórfico do gene SSU rRNA (Xiao *et al.* 1999a, 2000b). Posteriormente a segunda reacção de amplificação emprega um segundo par de oligonucleótidos iniciadores, CrySSU3 e CrySSU4, os quais se ligam às extremidades do amplicão obtido da primeira reacção, o que resulta na amplificação de um segundo fragmento de dimensões mais reduzidas (Xiao *et al.* 1999a). No quadro VII encontram-se descritas as sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados em ambas as reacções de PCR e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Quadro VII. Sequência dos oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação de um fragmento do gene SSU rRNA e tamanho dos fragmentos amplificados

Gene	Oligonucleótidos iniciadores	Sequência 5' → 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Ref ^a
SSU rRNA	CrySSU1	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG	≈ 1325	Xiao <i>et al.</i> 1999a
	CrySSU2	CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA		Xiao <i>et al.</i> 2000b
	CrySSU3	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG	≈ 831-838*	Xiao <i>et al.</i> 1999a
	CrySSU4	AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A		

* O tamanho do fragmento varia de acordo com a espécie e/ou genótipo de *Cryptosporidium*.

≈ Tamanho aproximado.

A realização de duas reacções de amplificação aumenta significativamente a sensibilidade da reacção, o que é extremamente importante quando se pretende detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. uma vez que estes estão geralmente presentes em número muito reduzido nas amostras biológicas. A especificidade da reacção também aumenta consideravelmente já que a utilização de dois pares de oligonucleótidos iniciadores distintos que emparelham na mesma região reforça a amplificação apenas do fragmento que se pretende amplificar (Morgan & Thompson, 1998; Sunnotel *et al.* 2006). O elevado risco de contaminação dos produtos de PCR constitui, no entanto, a principal desvantagem desta técnica (Morgan & Thompson, 1998).

A primeira reacção de amplificação foi efectuada num volume total de 25 µl contendo 2,5 µl 10 × tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 3 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,4 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems), 5 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, 0,01 mg de albumina sérica bovina (BSA, em inglês *bovine serum albumine*) (Fermentas, Reino Unido), 0,75 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), 3 µl de DNA genómico e água desionizada estéril para completar o volume final. Posteriormente, todos os microtubos foram submetidos a um *short spin* na micro-centrífuga 5415 D (Eppendorf, Alemanha) com o propósito de homogeneizar a mistura reaccional resultante. A segunda reacção de amplificação foi processada com 4,5 µl de produto de PCR da primeira reacção e, com excepção dos oligonucleótidos iniciadores utilizados (CrySSU3 e CrySSU4), recorreu-se aos mesmos reagentes nas mesmas concentrações para realizar a mistura reaccional.

Ambas as reacções de PCR foram processadas sequencialmente no termociclador T1 Thermocycler (Biometra, Alemanha) segundo as condições descritas no quadro VIII. Em cada reacção de PCR processada foram utilizadas uma amostra com DNA de *Cryptosporidium* spp. em condições óptimas de concentração, a qual funcionou como controlo positivo da reacção, e uma amostra contendo água desionizada estéril em vez de DNA, o qual funcionou como controlo negativo, permitindo, este último, verificar a existência de possíveis contaminações devido a DNA exógeno. Todos os procedimentos foram realizados numa câmara de segurança biológica de classe II (FASTER UltraSafe, Itália) para minimizar ao máximo possíveis contaminações.

Quadro VIII. Condições de amplificação do gene SSU rRNA

PCR	Condições de amplificação*			
	Fases	Temperatura	Duração	N.º de ciclos
SSU rRNA	Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
	Desnaturação	94°C	45 segundos	35
	Ligação	56°C	45 segundos	
	Extensão	72°C	1 minuto	
	Extensão final	72°C	10 minutos	1

*As condições de amplificação na primeira e segunda reacção são iguais.

2.4.1.2. Visualização dos produtos de PCR do gene SSU rRNA

Os produtos de PCR obtidos na segunda reacção da *nested*-PCR para o gene SSU rRNA foram posteriormente submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1× (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA; pH 8.3) e ao qual se adicionou brometo de etídio na concentração final 0,5 µg/ml (Sigma, EUA). Uma vez polimerizado, o gel foi colocado numa tina de electroforese e mergulhado em tampão TAE 1×. Posteriormente, a 17 µl de produto de PCR foi adicionado 1,5 µl de 6 × DNA *loading dye* (0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.6]) (Fermentas, Reino Unido). A migração dos produtos de PCR no gel foi realizada simultaneamente com um marcador de massa molecular de 1 quilobase (kb) (GeneRuler™ - Fermentas), tendo-se adicionado a 1 µl de marcador, 1,5 µl de 6 × DNA *loading dye* (Fermentas) e 10 µl de água desionizada estéril. Após a aplicação dos produtos de PCR e do marcador de massa molecular no gel, foi aplicada uma corrente eléctrica de 100 volts (V) durante 40 a 60 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados no transiluminador (Vilber Lourmat, França) sob luz ultravioleta (UV) devido à emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado na cadeia de DNA. Os géis foram seguidamente fotografados e as bandas de interesse excisadas do gel com a ajuda de um bisturi e conservados em microtubos a 4°C.

2.4.2. Locus GP60

O diagnóstico molecular com o *locus* GP60, e a sua subsequente caracterização genética foi realizado através da amplificação de um fragmento deste gene por um processo de *nested*-PCR, seguida da determinação das sequências nucleotídicas dos fragmentos amplificados. A determinação da sequência nucleotídica deste gene tem permitido evidenciar a existência de variabilidade dentro das espécies *C. parvum* e *C. hominis*, devido ao seu elevado grau de polimorfismo de sequência (Strong *et al.* 2000), verificando-se que os numerosos polimorfismos têm possibilitado a caracterização das famílias de subtipos e respectivos subtipos em cada uma destas espécies. Para além disso, para visualização da distribuição dos subtipos do gene GP60 caracterizados nos isolados de origem humana e animal, procedemos também à construção de uma árvore filogenética a partir do alinhamento múltiplo das sequências por nós obtidas com outras sequências de identidade conhecida do mesmo gene depositadas no *GenBank*.

2.4.2.1. Amplificação do *locus* GP60 por *nested*-PCR

A abordagem *nested*-PCR, como já foi referido, é uma técnica muito sensível e específica, muito útil na amplificação de DNA de espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* uma vez que normalmente os oocistos estão presentes em número muito reduzido nas amostras. O fundamento desta abordagem já foi descrito, no entanto, neste caso, a primeira reacção de amplificação emprega o par de oligonucleótidos iniciadores AL3531 e AL3533, os quais amplificam um fragmento relativamente grande do gene GP60, a nossa sequência-alvo. A segunda reacção de amplificação emprega um segundo par de oligonucleótidos iniciadores, distinto do primeiro, AL3532 e LX0029, os quais se ligam às extremidades do amplicão obtido da primeira reacção, o que resulta na amplificação de um segundo fragmento de dimensões mais reduzidas (Sulaiman *et al.* 2005). No quadro IX encontram-se descritas as sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados em ambas as reacções de PCR e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Quadro IX. Sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizadas na amplificação de um fragmento do gene GP60 e tamanho dos fragmentos amplificados

Gene	Oligonucleótidos iniciadores	Sequência 5' → 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Ref ^a
GP60	AL3531	ATA GTC TCC GCT GTA TTC	≈ 460	Sulaiman <i>et al.</i> 2005
	AL3533	GAG ATA TAT CTT GGT GCG		
	AL3532	TCC GCT GTA TTC TCA GCC	≈ 358	
	LX0029	CGA ACC ACA TTA CAA ATG AAG T		

≈ Tamanho aproximado.

A primeira reacção de amplificação foi efectuada num volume total de 25 µl contendo 2,5 µl 10 × tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 1,5 mM de MgCl₂ (50 mM) (Bioline), 0,4 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems), 5 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, 0,05 mg de BSA (Fermentas, Reino Unido), 0,75 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), 4 µl de DNA genómico e água desionizada estéril para completar o volume final. Posteriormente, todos os microtubos foram submetidos a um *short spin* na micro-centrífuga 5415 D (Eppendorf) com o propósito de homogeneizar a mistura reaccional resultante. A segunda reacção de amplificação foi processada com 8 µl de produto de PCR da primeira reacção tendo sido utilizados os mesmos reagentes nas mesmas concentrações para realizar a mistura reaccional à excepção da BSA cuja concentração diminui para 0,01mg e do segundo par de oligonucleótidos iniciadores (AL3532 e LX0029) cuja concentração aumenta para 7,5 pmol.

Ambas as reacções de PCR foram processadas sequencialmente no termociclador T1 Thermocycler (Biometra, Alemanha) segundo as condições descritas no quadro X. Em cada reacção de PCR processada foram utilizadas uma amostra com DNA de *Cryptosporidium* spp. em condições óptimas de concentração, a qual funcionou como controlo positivo da reacção, e uma amostra contendo água desionizada estéril em vez de DNA, o qual funcionou como controlo negativo, permitindo, este último, verificar a existência de possíveis contaminações devido a

DNA exógeno. Todos os procedimentos foram realizados numa câmara de segurança biológica de classe II (FASTER UltraSafe) para minimizar ao máximo possíveis contaminações.

Quadro X. Condições de amplificação do gene GP60

PCR	Condições de amplificação				
	Fases	Temperatura		Duração	N.º de ciclos
		GP60 I	GP60 II		
GP60	Desnaturação inicial	95°C	95°C	5 minutos	1
	Desnaturação	94°C	94°C	45 segundos	35
	Ligação	47°C	50°C	45 segundos	
	Extensão	72°C	72°C	1 minuto	
	Extensão final	72°C	72°C	10 minutos	1

GP60 I: Primeira reacção de PCR; GP60 II: Segunda reacção de PCR.

2.4.2.2. Visualização dos produtos de PCR do gene GP60

Os produtos de PCR obtidos a partir da segunda reacção de *nested*-PCR para o gene GP60 foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose em condições idênticas às descritas para os produtos de PCR do gene SSU rRNA (ver “2.4.1.2. Visualização dos produtos de PCR do gene SSU rRNA”), à excepção do marcador de massa molecular, que, embora preparado na mesma proporção que o anterior, neste caso, foi um marcador de 100 pb (GeneRuler™ - Fermentas).

2.5. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR de ambos os *loci*, SSU rRNA e GP60, obtidos das segundas reacções de amplificação foram, posteriormente, purificados com o *kit* comercial Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed™, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O princípio desta metodologia baseia-se na adsorção selectiva do DNA a uma superfície de sílica gel embutida nas bases das colunas Jetquick, e compreende quatro etapas fundamentais, nomeadamente a solubilização do gel de agarose, e posterior adsorção, lavagem e eluição do DNA.

Sucintamente, os fragmentos excisados dos géis de agarose foram colocados individualmente em microtubos de 1,5 ml e seguidamente pipetaram-se 350 µl de solução L1 (NaClO₄, acetato de sódio e TBE) com o objectivo de solubilizar o gel de cada amostra. A mistura incubou a 50°C durante 30 minutos, tendo sido agitada no vórtex em intervalos de 10 minutos. Entretanto colocou-se uma coluna Jetquick num tubo colector de 2 ml por amostra e transferiu-se a mistura obtida no passo anterior para a coluna. Centrifugou-se durante um minuto a $23.100 \times g$ na centrífuga Kubota 3300 (Kubota, Japão) e descartou-se o filtrado. De seguida adicionou-se novamente 350 µl de solução L1 (NaClO₄, acetato de sódio e TBE), aguardou-se um minuto e centrifugou-se, posteriormente, durante um minuto a $23.100 \times g$ tendo sido descartado o filtrado. Esta etapa adicional permite obter melhores resultados caso o DNA eluído seja utilizado para posterior reacção de sequenciação. Seguidamente o DNA adsorvido foi lavado com 250 µl de solução de lavagem L2 (etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCl) aguardámos cinco minutos e centrifugou-se durante um minuto a $23.100 \times g$ e descartou-se o filtrado. Foi realizada uma nova centrifugação durante um minuto a $23.100 \times g$ para remoção de possíveis vestígios da solução de lavagem, assegurando desta forma que nenhum etanol residual é transportado para a fase seguinte. Por fim, e para eluição do DNA da matriz de sílica, colocou-se a coluna num microtubo limpo de 1,5 ml, adicionou-se 40 µl de água desionizada estéril pré-aquecida a <65°C directamente no centro da matriz de sílica, aguardou-se cinco minutos e centrifugou-se durante dois minutos a $23100 \times g$. O DNA purificado foi conservado a -20°C.

2.6. Bioinformática: análise da diversidade genética por sequenciação

A sequenciação directa dos produtos de PCR tem revelado ser a abordagem *gold standard* na identificação das várias espécies e na detecção de variação genética ou de polimorfismos dentro e entre os amplicões (Jex *et al.* 2008a). Neste sentido, uma vez purificados, os produtos de PCR foram enviados para o laboratório comercial MacroGen onde foram submetidos a reacções de sequenciação directa utilizando o *kit* comercial BigDye® Terminator v3.1 tendo sido analisados no sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems). Para o efeito foram utilizados os oligonucleótidos iniciadores CrySSU3 e CrySSU4 para sequenciar os produtos de PCR do gene SSU rRNA obtidos na segunda reacção de amplificação, enquanto para sequenciar os produtos de PCR do gene GP60 obtidos na segunda reacção de amplificação, recorreu-se aos oligonucleótidos iniciadores AL3532 e LX0029. As sequências nucleotídicas dos fragmentos previamente amplificados de ambos os *loci*, SSU rRNA e GP60, foram sequenciadas em ambos os sentidos, de forma a obter as sequências consenso.

Seguidamente as sequências foram analisadas com o programa ChromasPro v1.5 (disponível em: <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>), e os electroferogramas obtidos foram cuidadosamente analisados e comparados com outras sequências de *Cryptosporidium* spp. de identidade conhecida depositadas no *GenBank* (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) através do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de forma a avaliar a semelhança entre as sequências por nós obtidas, e as sequências mais homólogas de *Cryptosporidium* spp. depositadas nesta base de dados, e procedermos à identificação das espécies, genótipos e/ou subtipos. Posteriormente, foi realizado um alinhamento múltiplo com todas as sequências por nós obtidas, sequencialmente para cada *locus* através do programa *Multiple sequence alignment by Florence Corpet* (MultAlin) (disponível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) tendo sido realizados alguns ajustes manuais aos alinhamentos resultantes, com o intuito de eliminar algumas imprecisões que pudessem interferir com a interpretação final.

A análise filogenética foi realizada nas sequências alinhadas por nós obtidas no *locus* GP60, em associação com outras de identidade conhecida do mesmo gene

depositadas no *GenBank*, com o intuito de avaliar as relações filogenéticas entre os diversos subtipos de *C. parvum* caracterizados neste e noutros estudos. A árvore filogenética foi construída através do método *neighbor joining* utilizando o programa Treecon W, tendo por base distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Os números descritos acima dos ramos indicam os valores de confiança obtidos através da análise de *bootstrap* com 1.000 réplicas.

RESULTADOS

3.1. Diagnóstico parasitológico

O estudo abrangeu 48 amostras fecais de 48 indivíduos, 11 provenientes de humanos e 37 provenientes de animais, de entre os quais 29 eram bovinos e oito eram suínos. Todas as amostras biológicas foram analisadas parasitologicamente através da pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos esfregaços fecais directo e dos sedimentos. Para além do diagnóstico parasitológico, procedeu-se ainda à quantificação da intensidade da infecção e à caracterização morfológica dos oocistos em todos os isolados positivos.

Os resultados do diagnóstico parasitológico e molecular com ambos os *loci* SSU rRNA e GP60 encontram-se resumidos no quadro XI. No que respeita ao diagnóstico parasitológico, de entre as 11 amostras fecais provenientes de humanos, apenas três revelaram oocistos nos esfregaços fecais, verificando-se uma frequência de infecção de 27,3% (3/11). Na população bovina, oito das 29 amostras foram positivas para o diagnóstico de infecção por *Cryptosporidium* spp., o que corresponde a uma frequência de infecção nestes hospedeiros de 27,6% (8/29). Relativamente aos oito hospedeiros suínos, apenas um revelou estar infectado por *Cryptosporidium* spp., verificando-se uma frequência de infecção de 12,5% (1/8).

Quadro XI. Resultados do diagnóstico parasitológico e molecular com os *loci* SSU rRNA e GP60 nos isolados de origem humana e animal

Hospedeiro (n)	Diagnóstico parasitológico		Diagnóstico molecular			
			SSU rRNA		GP60	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Humanos (11)	27,3% (3)	72,7% (8)	18,2% (2)	81,8% (9)	36,4% (4)	63,6% (7)
Bovinos (29)	27,6% (8)	72,4% (21)	41,4% (12)	58,6% (17)	58,6% (17)	41,4% (12)
Suínos (8)	12,5% (1)	87,5% (7)	0% (0)	100% (8)	12,5% (1)	87,5% (7)
Total (48)	25% (12)	75% (36)	29,2% (14)	70,8% (34)	45,8% (22)	54,2% (26)

A quantificação da carga parasitária (quadro VI, ver “2.2.4. Observação microscópica” no capítulo Material e Métodos) foi realizada posteriormente em todos os isolados cujo diagnóstico parasitológico foi positivo. Neste estudo, a carga parasitária nos vários hospedeiros infectados variou entre baixa (+), moderada (++) e alta (+++), tendo sido obtida para cada nível de parasitismo uma positividade de 58,3% (7/12), 25% (3/12), e 16,7% (2/12), respectivamente. Dos três humanos infectados por *Cryptosporidium* spp. 33,3% (1/3) revelaram moderado (++) número de oocistos no esfregaço, enquanto nos restantes 66,7% (2/3) dos isolados positivos foram observados um elevado número de oocistos, tendo sido a intensidade da infecção classificada como alta (+++) nestas amostras. Comparativamente aos isolados com origem nos hospedeiros humanos, aqueles provenientes dos hospedeiros animais revelaram a presença de um reduzido número de oocistos, verificando-se que nestes, a carga parasitária variou entre baixa a moderada. Dos oito bovinos infectados com criptosporídeos, 75% (6/8) revelaram um reduzido número de oocistos (+) nos esfregaços, enquanto os restantes 25% (2/8) dos isolados positivos apresentaram um nível de parasitismo moderado (++) . Por outro lado, no único isolado positivo proveniente do hospedeiro suíno (100%; 1/1), à semelhança da maioria dos isolados de origem bovina, apenas foram observados alguns oocistos e, como tal, a intensidade de infecção foi classificada como baixa (+). Na figura 8 está representada graficamente a distribuição dos níveis de parasitismo em função do hospedeiro.

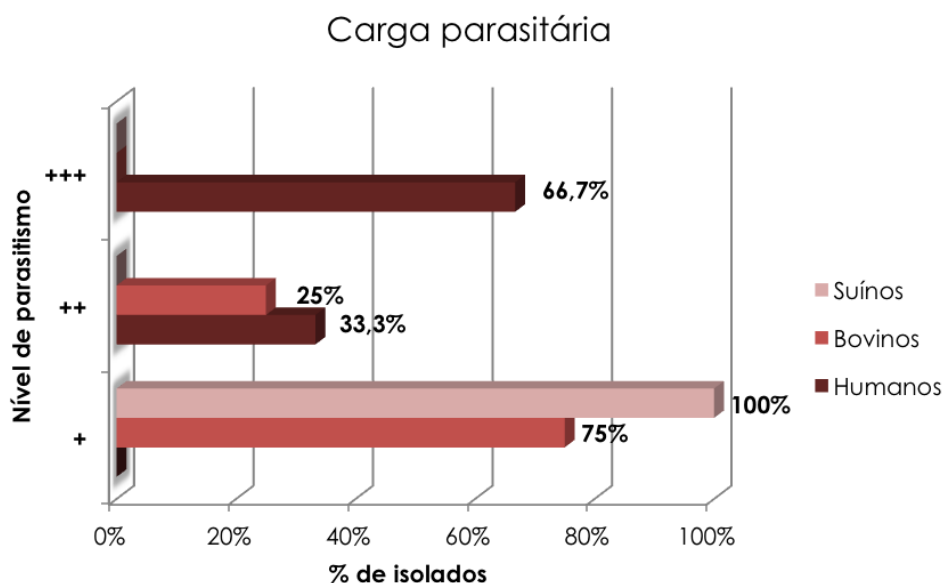


Figura 8. Distribuição dos níveis de parasitismo em função do hospedeiro

Algumas das características mais proeminentes dos oocistos foram observadas durante a realização do diagnóstico parasitológico. Os oocistos, conforme se observa na figura 9, apresentaram caracteristicamente uma tonalidade rosa e, de uma forma geral, uma forma esférica, por vezes ligeiramente ovalada. Em vários isolados foi possível observar no interior dos oocistos pequenas granulações. Contudo, em amostras muito espessas e pastosas, estas estruturas internas não foram observadas e, neste caso, a estrutura interna dos oocistos assemelhou-se a uma massa densa e homogénea. A parede refringente destas estruturas foi evidente em oocistos que mantinham a estrutura preservada. Não foram registadas diferenças entre os oocistos observados nos isolados provenientes dos hospedeiros humanos e animais.

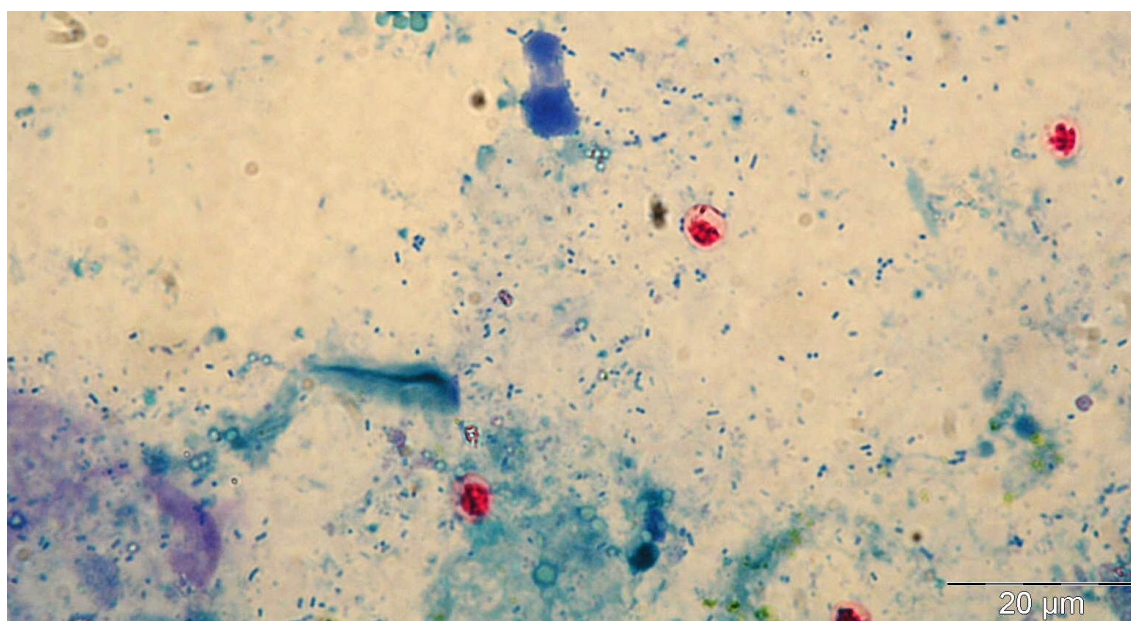


Figura 9. Oocistos de *C. parvum* corados por Ziehl-Neelsen modificado. A observação microscópica foi realizada com a ampliação de $\times 1000$. Fotografia da autora.

3.2. Diagnóstico e caracterização dos isolados de *Cryptosporidium* spp. por métodos moleculares

Neste estudo, e uma vez que as metodologias microscópicas não são suficientemente sensíveis na detecção de oocistos de espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, todas as amostras fecais anteriormente processadas para o diagnóstico parasitológico foram submetidas à amplificação sequencial de dois *loci*, SSU rRNA e GP60, através da técnica de *nested*-PCR. A abordagem do diagnóstico molecular tem como principal objectivo identificar o maior número possível de isolados positivos, assim como confirmar os resultados obtidos através do diagnóstico parasitológico. Por outro lado, também a determinação das sequências nucleotídicas dos fragmentos amplificados por ambos os *loci* permite caracterizar a nível molecular os isolados obtidos. Nomeadamente a caracterização do *locus* SSU rRNA tem como finalidade a identificação das espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* spp. responsáveis pela infecção nos diversos hospedeiros infectados, enquanto a caracterização do *locus* GP60 tem como principais objectivos a determinação das famílias de subtipos e respectivos subtipos nos isolados de *C. parvum* e/ou de *C. hominis* eventualmente descritos neste estudo, mas também a confirmação dos resultados obtidos através do *locus* SSU rRNA.

3.2.1. *Locus* SSU rRNA

3.2.1.1. Diagnóstico molecular com o gene SSU rRNA

A electroforese dos fragmentos amplificados do gene SSU rRNA das espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* por *nested*-PCR, através do DNA genómico obtido a partir das amostras biológicas dos diversos hospedeiros, está representada na figura 10. Em todos os isolados, o tamanho dos produtos amplificados, como se pode observar por comparação com o marcador de massa molecular, está compreendido entre 750 a 1.000 pb. Este resultado permite constatar que a região amplificada foi aquela que era pretendida, uma vez que o segundo par de oligonucleótidos iniciadores utilizado neste estudo amplifica um fragmento com um tamanho aproximado de 830 pb (ver quadro VII, “2.4.1.1. Amplificação do *locus* SSU rRNA por *nested*-PCR” no capítulo Material e Métodos). A amplificação por *nested*-PCR do *locus* SSU rRNA realizada nas 48 amostras fecais, permitiu amplificar com sucesso, no geral, o DNA genómico de

espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* de 29,2% (14/48) dos isolados, como se pode observar pela análise do quadro XI. De entre as 11 amostras provenientes dos humanos, apenas 18,2% (2/11) foram positivas, enquanto de entre as 29 amostras provenientes de bovinos, a positividade foi obtida em 41,4% (12/29) das amostras. Contudo, a amplificação deste *locus* não foi conseguida em nenhuma das amostras provenientes dos hospedeiros suínos, ainda que uma destas (RP8), como já foi referido, tenha revelado a presença de oocistos de criptosporídeos ao microscópio. Para além desta última, como se pode verificar no quadro XIV, a análise molecular foi também negativa em três isolados nos quais foram observados previamente oocistos, nomeadamente num isolado proveniente de um hospedeiro humano (RH8) e em dois isolados provenientes de hospedeiros bovinos (RB7 e RB15). A carga parasitária destes isolados era moderada (++) relativamente ao isolado com origem no hospedeiro humano, e baixa (+) para os isolados provenientes dos animais.

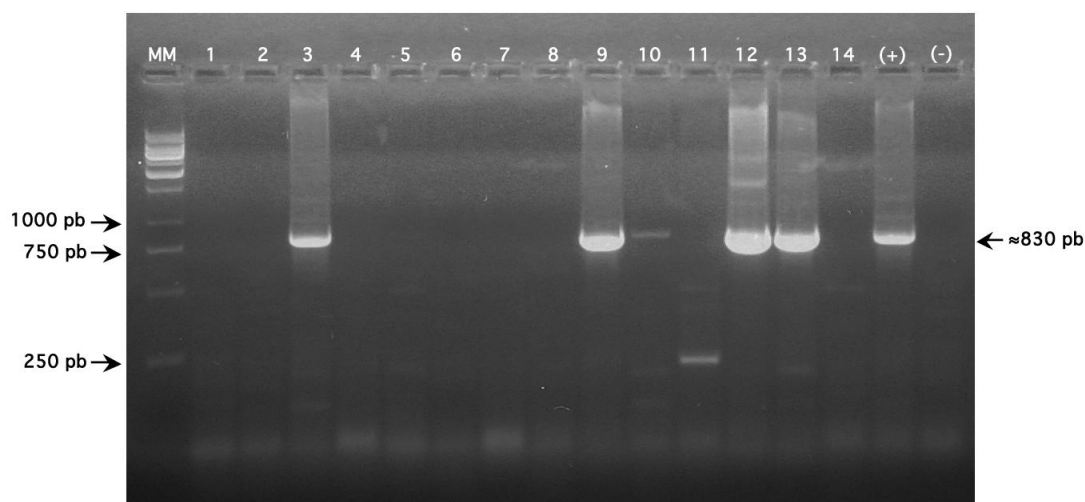


Figura 10. Gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene SSU rRNA por *nested*-PCR

Amostras submetidas a amplificação: Poços 1 e 11, isolados provenientes de humanos; Poços 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 e 14, isolados provenientes de bovinos; Poço 4, isolado proveniente de um suíno; (+), controlo positivo com DNA de *C. parvum*; (-), controlo negativo sem DNA. MM, Marcador de massa molecular de 1 kb. ≈ Tamanho aproximado.

3.2.1.2. Caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* spp.

As sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação de todos os fragmentos do gene SSU rRNA amplificados por *nested*-PCR foram alinhadas com recurso ao programa BLAST, com sequências de identidade conhecida do mesmo gene depositadas no *GenBank*. As sequências nucleotídicas dos nossos isolados foram 100% homólogas a três tipos de sequências nucleotídicas previamente descritas nesta base de dados, depositadas sob os números de acesso DQ656355, JN247404 e AB513881 (quadro XII), o que permitiu a identificação de todas as espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* envolvidas na infecção dos diversos hospedeiros. Neste estudo, todos os isolados positivos provenientes de todos os hospedeiros, humanos e animais, estavam infectados por uma única espécie, *C. parvum* (100%). O alinhamento de todas as sequências dos isolados positivos obtidos neste estudo encontra-se representado no anexo 1, onde é possível verificar que todas as sequências alinham perfeitamente entre si, corroborando a existência de uma única espécie em todos os hospedeiros infectados.

Quadro XII. Características das sequências do gene SSU rRNA dos isolados positivos

Isolado	Hospedeiro	Tamanho da sequência (pb)	Espécie/genótipo	Número de acesso do <i>GenBank</i>
RH2	Humano	806	<i>C. parvum</i>	JN247404
RH7	Humano	834	<i>C. parvum</i>	DQ656355
RB2	Bovino	822	<i>C. parvum</i>	DQ656355
RB4	Bovino	833	<i>C. parvum</i>	DQ656355
RB5	Bovino	824	<i>C. parvum</i>	JN247404
RB9	Bovino	834	<i>C. parvum</i>	DQ656355
RB12	Bovino	835	<i>C. parvum</i>	AB513881
RB14	Bovino	839	<i>C. parvum</i>	AB513881
RB16	Bovino	839	<i>C. parvum</i>	AB513881
RB17	Bovino	828	<i>C. parvum</i>	AB513881
RB20	Bovino	832	<i>C. parvum</i>	DQ656355
RB24	Bovino	834	<i>C. parvum</i>	DQ656355
RB26	Bovino	839	<i>C. parvum</i>	AB513881
RB27	Bovino	837	<i>C. parvum</i>	AB513881

RH: isolado humano; RB: isolado bovino.

3.2.2. *Locus* GP60

3.2.2.1. Diagnóstico molecular com o gene GP60

A electroforese dos fragmentos amplificados do gene GP60 de *C. parvum* por *nested*-PCR, através do DNA genómico obtido a partir das amostras biológicas dos diversos hospedeiros está representada na figura 11. Em todos os isolados positivos, o tamanho dos produtos amplificados, como se pode observar por comparação com o marcador de massa molecular, está compreendido entre 300 a 400 pb. Este resultado permite constatar que a região amplificada foi aquela que era pretendida, uma vez que, o segundo par de oligonucleótidos iniciadores utilizado neste estudo amplifica um fragmento com um tamanho aproximado de 360 pb (ver quadro IX, “2.4.2.1. Amplificação do *locus* GP60 por *nested*-PCR” no capítulo Material e Métodos). Além disso, é possível verificar que o gel de electroforese dos produtos de PCR, como se pode observar na seguinte figura, não apresenta bandas inespecíficas, o que indica que a reacção de PCR foi muito específica, amplificando somente os fragmentos pretendidos.

A amplificação deste *locus* revela uma frequência de infecção mais elevada comparativamente à amplificação do *locus* SSU rRNA, uma vez que a análise molecular realizada nas 48 amostras fecais permitiu amplificar com sucesso, no geral, o DNA genómico de 45,8% (22/48) dos isolados, como se pode observar pela análise do quadro XI. De entre os 11 isolados provenientes de humanos, 36,4% (4/11) foram positivos, enquanto de entre as 29 amostras provenientes de bovinos, a percentagem de infecção obtida foi 58,6% (17/29). Relativamente aos isolados provenientes dos suínos, a percentagem de amplificação foi de apenas 12,5% (1/8). Importa referir que num dos isolados bovinos cuja amplificação do *locus* SSU rRNA foi positiva (RB5), a amplificação do *locus* GP60, por sua vez, não foi bem-sucedida. Neste isolado, como se pode verificar pela análise do quadro XIV, não foram observados oocistos de criptosporídeos ao diagnóstico parasitológico.

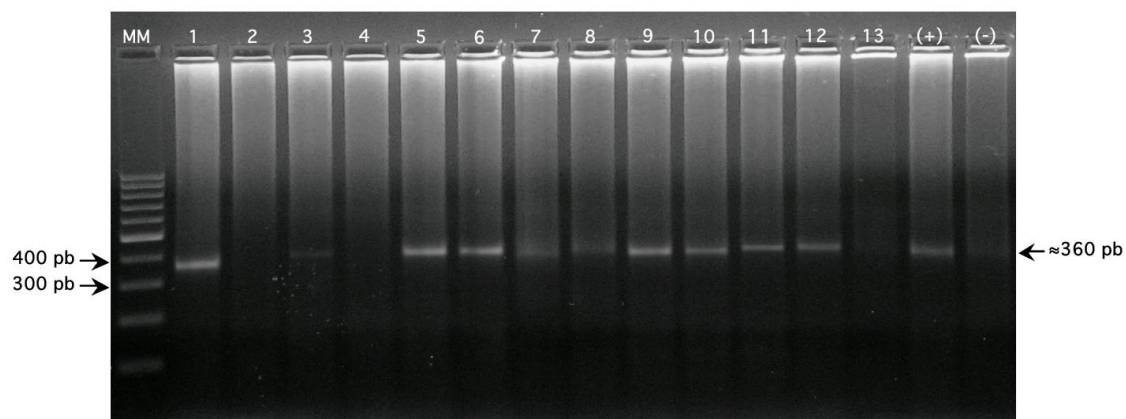


Figura 11. Gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene GP60 por *nested*-PCR

Amostras submetidas a amplificação: Poços 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 isolados provenientes de bovinos; Poços 2, 4 e 7, isolados provenientes de humanos; (+), controle positivo com DNA de *C. parvum*; (-), controle negativo sem DNA. MM, Marcador de massa molecular de 100 pb. ≈ Tamanho aproximado.

3.2.2.2. Caracterização intra-molecular de *C. parvum*

As sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação de todos os fragmentos do gene GP60 amplificados por *nested*-PCR foram alinhadas com recurso ao programa BLAST, com sequências de identidade conhecida do mesmo gene depositadas no *GenBank*. A determinação das sequências nucleotídicas dos fragmentos do gene GP60 amplificados e o seu posterior alinhamento com sequências de identidade conhecida depositadas nesta base de dados, permitiu constatar que, os isolados que apenas amplificaram este *locus*, à semelhança dos resultados relativos à sequenciação dos fragmentos do gene SSU rRNA amplificados, dizem respeito somente à espécie *C. parvum* e permitiu, adicionalmente, a identificação dos subtipos de *C. parvum* presentes neste estudo. As sequências nucleotídicas de cinco subtipos identificados neste estudo, IIdA16G1R1, IIdA21G1a, IIdA22G1, IIdA25G1 e IIdA26G1 encontram-se depositadas no *GenBank* respectivamente sob os números de acesso AY149615, AB560746, EU549715, EU549712 e EU549713. Um sexto subtipo, como descrito adiante, foi caracterizado pela primeira vez neste estudo, tendo em conta a sequência e o número de repetições dos codões TCA e TCG na região dos microssatélites (figura 12), que se revela bastante polimórfico, e permite a discriminação dos diversos subtipos caracterizados neste estudo.

	71							140
RB6	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	C-----GTC	
RB4	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCGTC	
RB27	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCGTC	
RB14	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCGTC	
RB8	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCGTC	
RB19	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCGTC	
RB16	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCGTC	
RB22	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	C-----GTC	
RB15	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCGTC	
RB7	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	C-----GTC	
RB26	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TC-----GTC		
RH8	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TC-----GTC		
RH7	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TC-----GTC		
RH1	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TC-----GTC		
RB2	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TC-----GTC		
RB9	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATC-	-----GTC		
RB24	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	C-----GTC	
RH2	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TC-----GTC		
RB17	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCGTC	
RB12	TTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	C-----GTC	
RP2	GTTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATC---GTC	
RB20	GTCATCATC	ATCATCATCA	TCATCATCAT	CATCATCATC	ATCATCATCA	TCAACATCAA	C-----CGTC	
	141							210
RB6	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB4	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB27	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB14	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB8	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB19	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB16	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB22	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB15	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB7	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB26	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RH8	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RH7	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RH1	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB2	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB9	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB24	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RH2	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB17	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB12	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RP2	ATCATCATCA	TCATCAACAT	CGACTGTAGC	ACCAACTCCA	AAGAAAGAAA	GAACGGAGA	GGAAGTAGGT	
RB20	G-CACAGCA	AATAAGGCAA	GAACGGAGA	A--GACGAG	AAGGCAGTCA	AGATTCTAGT	GG-----T	

Figura 12. Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene GP60 de todos os isolados de *C. parvum* na região dos microssatélites (do nucleótido 73 ao 156). O codão TCA está representado a laranja e o codão TCG a verde em todos os subtipos da família de subtipo IId. No subtipo da família de subtipo IIA, o codão TCA está destacado a vermelho, o codão TCG a azul, e a sequência R1 (ACATCA) a roxo. Os nucleótidos sublinhados neste subtipo indicam as dissimilares relativamente a todos os outros subtipos da família IId. Os números acima das sequências indicam a distância dos nucleótidos relativamente ao início do fragmento amplificado. Os traços indicam deleções. RH: isolado humano; RB: isolado bovino; RP: isolado suíno.

A nomenclatura dos subtipos, como já foi referido (ver “1.7.1.2. Locus GP60” no capítulo Introdução Geral), é realizada tendo em conta o número de repetições dos codões TCA, TCG e/ou TCT na região dos microssatélites. As sequências nucleotídicas de todos os isolados positivos relativamente a esta região, conforme se observa na

figura 12, variam entre si essencialmente pelo número de repetições do codão TCA. Os subtipos da família IId apresentam um número de repetições do codão TCA, variável entre 21 a 27, sendo o codão e o respectivo número de repetições representado por A21, A22, A25, A26 e A27. Por outro lado, todos estes subtipos apresentam adicionalmente um único codão TCG, o qual é representado por G1. A designação destes subtipos inclui a referência à família de subtipo seguida da designação e do número de repetições dos codões TCA e TCG e, como tal, os subtipos da família IId identificados neste estudo dizem respeito aos subtipos IIdA21G1a, IIdA22G1, IIdA25G1, IIdA26G1 e IIdA27G1. Relativamente ao subtipo da família IIa identificado neste estudo, este possui 16 repetições do codão TCA, o qual é representado por A16, e um único codão TCG, representado por G1. Contudo, contrariamente às sequências dos subtipos da família IId, este subtipo possui adicionalmente a jusante dos codões de repetição, uma cópia da sequência ACATCA a qual é representada por R1, sendo a sua designação final IIaA16G1R1. No anexo 2 encontra-se representado o alinhamento de todas as sequências dos isolados positivos deste estudo caracterizados no *locus* GP60.

Entre todas as sequências nucleotídicas obtidas, apenas a sequência do isolado RB20, caracterizada com o subtipo IIaA16G1R1, foi 100% homóloga (em 367 pb), à sequência depositada no *GenBank* (AY149615). Todas as outras sequências identificadas neste estudo, nomeadamente as sequências caracterizadas na família de subtipo IId, foram apenas 99% homólogas às sequências depositadas nesta base de dados, devido à presença de pelo menos um polimorfismo na região 3' relativamente à sequência originalmente descrita. O grau de polimorfismo genético dos isolados de *C. parvum* caracterizados neste estudo foi analisado através de alinhamentos entre as sequências do gene GP60 por nós obtidas e aquelas depositadas previamente no *GenBank* caracterizadas com o mesmo subtipo, como se encontra representado nas seguintes figuras.

O alinhamento entre a sequência do isolado caracterizado com o subtipo IIdA21G1a (RB9) e a sequência AB560746 depositada no *GenBank* demonstra, conforme se observa na figura 13, a existência de dois polimorfismos, nomeadamente na posição 295 está presente a mudança de uma adenina (A) para uma guanina (G), enquanto na posição 348 está presente a alteração de uma timina (T) para uma A. A sequência do isolado RB9 foi 99% homóloga, em 348 pb, à sequência AB560746.

	291		350
AB560746	CACA	ACTACC GAAACCACAG AAGCTGCTCC AAAGAAAGAG TGC	GGTACTT CATTGT
RB9G.....A..

Figura 13. Alinhamento entre a sequência nucleotídica AB560746 e a sequência do isolado caracterizado com o subtipo IIdA21G1a. Os nucleótidos da sequência original estão destacados a laranja enquanto os polimorfismos do isolado deste estudo estão destacados a azul. A distância dos nucleótidos relativamente ao início do fragmento amplificado está representada pelos números acima das sequências. Os pontos indicam a identidade de sequência com a sequência do *GenBank* alinhada. RB: isolado bovino.

De forma semelhante, o alinhamento entre as sequências dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA22G1 (RH1, RH2, RH7, RH8, RB2 e RB26) e a sequência EU549715 depositada no *GenBank* demonstra a existência de polimorfismos. Os polimorfismos identificados, no entanto, não são homogêneos entre as várias sequências. Conforme se observa na figura 14, três dos seis isolados apresentam nas posições 299 e 304 a mudança de A para G, enquanto na posição 357, todas as sequências dos nossos isolados apresentam a alteração de uma T para uma A. As sequências dos nossos isolados foram 99% homólogas à sequência EU549715, em 314 pb para os isolados RH1, RH2, RH7 e RB2, e em 318 e 322 pb, respectivamente para os isolados RB26 e RH8.

	291		360
EU549715	AACTGAAG	ACAACTACCG AAACCACAGA AGCTGCTCCA AAGAAAGAGT GCGGTACTTC ATTTGT	TATG
RH1A..
RH7A..
RB2G..	...G.....A..
RH8G..	...G.....A..
RB26G..	...G.....A..
RH2A..

Figura 14. Alinhamento entre a sequência nucleotídica EU549715 e as sequências dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA22G1. Os nucleótidos da sequência original estão destacados a laranja enquanto os polimorfismos dos isolados deste estudo estão destacados a azul. A distância dos nucleótidos relativamente ao início do fragmento amplificado está representada pelos números acima das sequências. Os pontos indicam a identidade de sequência com a sequência do *GenBank* alinhada. RH: isolado humano; RB: isolado bovino.

Por sua vez, os isolados cujas sequências foram caracterizadas com o subtipo IIdA25G1 (RB6, RB7, RB12, RB22 e RB24), quando alinhados com a sequência EU549712 depositada no *GenBank*, à semelhança das anteriores também apresentam polimorfismos comparativamente à sequência originalmente descrita, os quais variam

consoante o isolado. Na figura 15 é possível observar que todas as sequências apresentam na posição 313 a mudança de A para G, no entanto, enquanto na posição 366, dois isolados apresentam a mudança de T para A, um terceiro isolado apresenta nesta mesma posição a mudança de T para G. Duas das sequências deste grupo apresentam apenas um polimorfismo já que sua a sequência nucleotídica é mais curta comparativamente às outras. As sequências dos isolados foram 99% homólogas à sequência EU549712, em 323 pb para os isolados RB6 e RB22, e em 327, 296 e 280 pb, respectivamente para os isolados RB7, RB24 e RB12.

	301							370
EU549712	ACTGAAGGCA	CAACTACCGA	AACCACAGAA	GCTGCTCCAA	AGAAAGAGTG	CGGTACTTCA	TTTGTATGT	
RB6G.....A.....	
RB22G.....G.....	
RB7G.....A.....	
RB24G.....	
RB12G.....	

Figura 15. Alinhamento entre a sequência nucleotídica EU549712 e as sequências dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA25G1. Os nucleótidos da sequência original estão destacados a laranja enquanto os polimorfismos dos isolados deste estudo estão destacados a azul e a vermelho. A distância dos nucleótidos relativamente ao início do fragmento amplificado está representada pelos números acima das sequências. Os pontos indicam a identidade de sequência com a sequência do *GenBank* alinhada. RB: isolado bovino.

O alinhamento entre a sequência do isolado caracterizado com o subtipo IIdA26G1 (RP2) e a sequência EU549713 depositada no *GenBank* demonstra, conforme se observa na figura 16, a existência de um polimorfismo na posição 252, nomeadamente a mudança de A para G. A sequência do isolado RP2 foi 99% homóloga, em 282 pb, à sequência EU549713.

	201							270
EU549713	CAGACCGAGA	GTACTGTTTC	TCAAAATACT	CCAGCTCAAA	CTGAAGGCAC	AACTACCGAA	ACCACAGAAG	
RP2G.....	

Figura 16. Alinhamento entre a sequência nucleotídica EU549713 e a sequência do isolado caracterizado com o subtipo IIdA26G1. Os nucleótidos da sequência original estão destacados a laranja enquanto os polimorfismos do isolado deste estudo estão destacados a azul. A distância dos nucleótidos relativamente ao início do fragmento amplificado está representada pelos números acima das sequências. Os pontos indicam a identidade de sequência com a sequência do *GenBank* alinhada. RP: isolado suíno.

O sexto subtipo determinado neste estudo, IIdA27G1, tanto quanto sabemos é um subtipo novo, caracterizado pela primeira vez neste estudo. As sequências nucleotídicas dos isolados classificados com este subtipo (RB4, RB8, RB14, RB15, RB16, RB17, RB19, RB27) alinharam com outras sequências cuja região dos microssatélites continha um número de repetições dos codões TCA e TCG aproximado ao deste subtipo, nomeadamente a sequência EU549713 depositada no *GenBank*, caracterizada com o subtipo IIdA26G1. Conforme se observa na figura 17(A), o alinhamento da sequência EU549713 com as sequências dos nossos isolados diferem entre si por um trinucleótido ATC (destacado a rosa), o qual produz nas sequências dos nossos isolados um codão TCA adicional comparativamente à sequência EU549713 depositada no *GenBank*. O alinhamento entre estas sequências, corrobora desta forma, a existência de 27 codões TCA e um codão TCG nas sequências dos nossos isolados. Também o alinhamento das sequências dos nossos isolados, como está representado na figura 17(B), permite constatar que à semelhança dos anteriores, as sequências nucleotídicas destes isolados são heterogêneas entre si. Dos oito isolados, quatro apresentam na posição 366 uma A, enquanto três apresentam na mesma posição uma G. Um dos isolados apresenta uma sequência muito curta, e como tal não é possível identificar se nesta mesma posição, a sequência possui uma A ou uma G.

O grau de polimorfismo genético entre os isolados de *C. parvum* deste estudo foi analisado através do alinhamento múltiplo de todas as sequências do gene GP60 por nós obtidas. Um dos isolados (RB20) é claramente distinto de todos os outros, tal como era esperado, tendo em conta que pertence a uma família de subtipo distinta dos restantes (IIa). Por outro lado, o alinhamento de todas as sequências nucleotídicas da família de subtipo IId, permite verificar, conforme se observa na figura 18, que apesar das sequências serem idênticas entre si na região não repetitiva, as sequências de sete isolados destacam-se das restantes devido à existência de pelo menos um polimorfismo. As sequências dos três isolados, RH1, RH2 e RH7, todas provenientes de hospedeiros humanos, diferem em dois polimorfismos na região 3' do gene, nomeadamente nas posições 317 e 322 estas apresentam uma A, enquanto todas as outras sequências apresentam nessas mesmas posições uma G. Adicionalmente, quatro sequências provenientes de hospedeiros bovinos, RB8, RB15, RB22 e RB27, diferem das restantes sequências por um único polimorfismo na região 3' do gene, pois enquanto estes

apresentam na posição 375 uma G, as restantes apresentam nessa mesma posição uma A.

(A)	
	61 120
EU549713	GAGGGTTCAT CATCATCATC ATCATCATCA TCATCATCAT CATCATCATC ATCATCATCA
RB4
RB15
RB14
RB27
RB8
RB19
RB16
RB17
121 180	
EU549713	TCATCATC-- -GTCATCATC ATCATCATCA ACATCGACTG TAGCACCAAC TCCAAAGAAA
RB4AT C.....
RB15AT C.....
RB14AT C.....
RB27AT C.....
RB8AT C.....
RB19AT C.....
RB16AT C.....
RB17AT C.....
(B)	
	311 370
RB4	CAGCTACCGA AACCACAGAA GCTGCTCCAA AGAAAGAGTG CGGTACTTCA TTTGTAAATGT
RB15G.....
RB14G.....
RB27G.....
RB8G.....
RB19G.....
RB16G.....
RB17G.....

Figura 17. (A) Alinhamento entre a sequência nucleotídica EU549713 e as sequências dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA27G1 na região dos microssatélites (do nucleótido 67 ao 150). Os trinucleótidos ATC adicionais nas sequências dos isolados deste estudo encontram-se destacados a rosa. (B) Alinhamento das sequências nucleotídicas dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA27G1. Os nucleótidos que diferem entre as várias sequências encontram-se destacados a azul e a verde. A distância dos nucleótidos relativamente ao início do fragmento amplificado está representada pelos números acima das sequências. Os traços indicam deleções. Os pontos indicam a identidade de sequência com a sequência do *GenBank* alinhada, e entre as sequências dos isolados deste estudo. RB: isolado bovino.

	311						380
RB6	CTGAAGGCAC	AGCTACCGAA	ACCACAGAAG	CTGCTCCAAA	GAAAGAGTGC	GGTACTTCAT	TTGTAATGTG
RB4
RB27G.....
RB14
RB8G.....
RB19
RB16
RB22G.....
RB15G.....
RB7
RB26
RH8
RH7A.....A.....
RH1A.....A.....
RB2
RB9
RB24
RH2A.....A.....
RB17
RB12
RP2
RB20	G.....G.	A.....T.....	A.....	AG.....A.....C.....

Figura 18. Alinhamento da região 3' de todas as sequências nucleotídicas do gene GP60 dos isolados de *C. parvum* caracterizados neste estudo. Os nucleótidos que diferem entre as várias sequências encontram-se destacados a verde e laranja. Os nucleótidos destacados a azul no único subtipo da família de IIa indicam as dissimilaridades relativamente a todos os outros subtipos da família de subtipo IId. Os números acima das sequências indicam a distância dos nucleótidos relativamente ao início do fragmento amplificado por *nested*-PCR. Os pontos indicam a identidade de sequência. RH: isolado humano; RB: isolado bovino; RP: isolado suíno.

Os resultados deste estudo revelam alguma diversidade genética entre os isolados de *C. parvum* caracterizados, ao verificar-se a existência de sequências heterogêneas dentro de alguns dos subtipos. Com o objectivo de avaliar as relações filogenéticas e a distribuição dos subtipos de *C. parvum* caracterizados na população humana e animal deste estudo, foi construída uma árvore filogenética com base na existência de polimorfismos na região 3' das sequências do gene GP60 dos diversos subtipos de *C. parvum* caracterizados. Para uma melhor compreensão destes dados, as sequências dos nossos isolados foram simultaneamente alinhadas com diversas sequências previamente depositadas no *GenBank* e descritas em várias regiões do mundo, conforme se observa na figura 19.

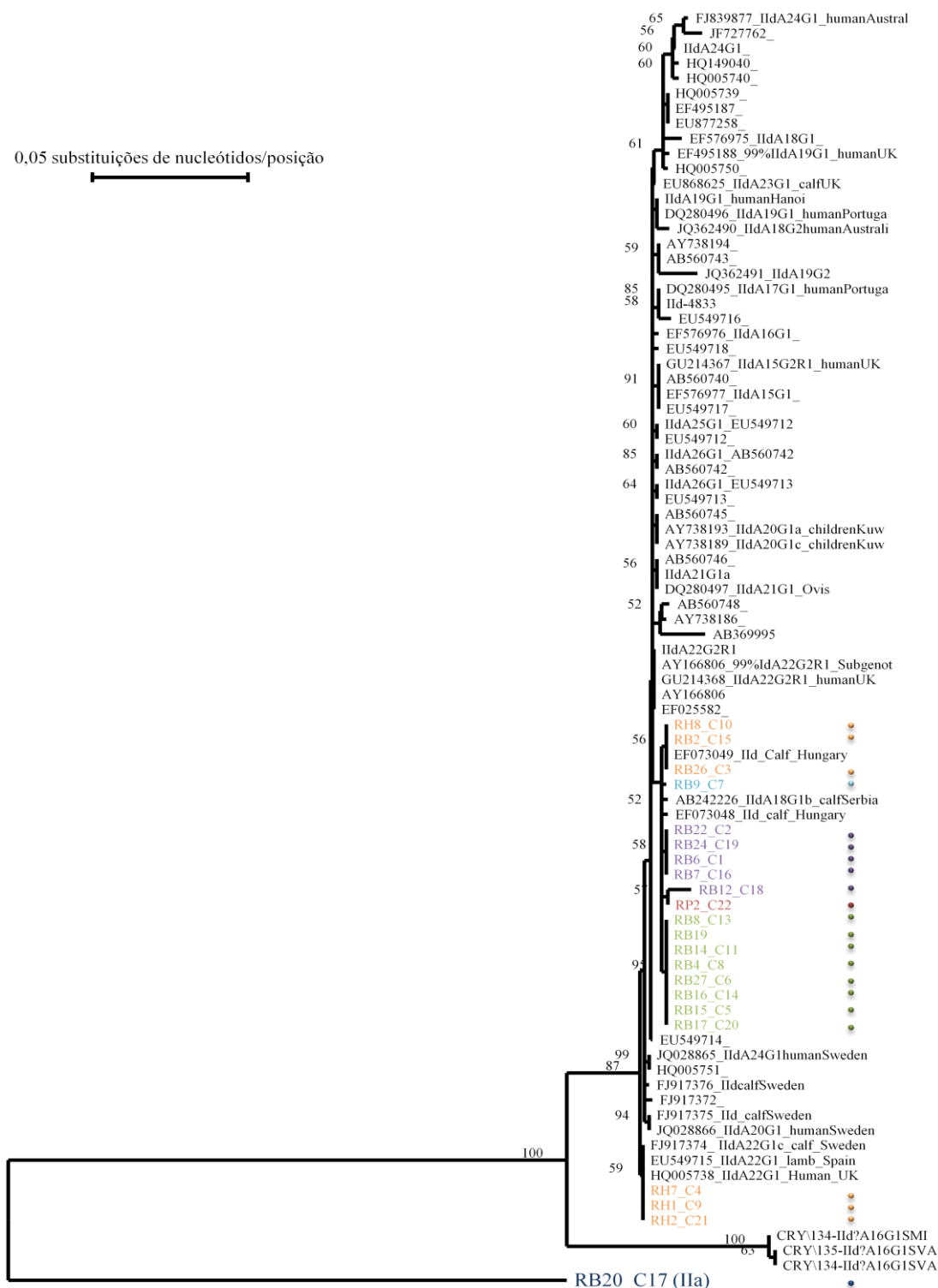


Figura 19. Relação filogenética entre os subtipos de *C. parvum* caracterizados neste estudo e outras sequências depositadas no *GenBank*, inferida pela análise de sequência do gene GP60 através do método *neighbor joining*, tendo por base distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Os números descritos acima dos ramos indicam os valores de confiança obtidos através análise de *bootstrap* com 1.000 réplicas. Os pontos representam os subtipos caracterizados neste estudo: IIdA21G1a ●; IIdA22G1 ●; IIdA25G1 ●; IIdA26G1 ●; IIdA27G1 ●; IIdA16G1R1 ●. RH: isolado humano; RB: isolado bovino; RP: isolado suíno.

3.2.2.3. Distribuição e prevalência das famílias de subtipo e subtipos de *C. parvum*

A distribuição e prevalência das duas famílias de subtipo caracterizadas neste estudo são bastante díspares. A família de subtipo IIa foi apenas caracterizada nos bovinos, enquanto a família de subtipo IId foi caracterizada na população humana e animal. Relativamente à prevalência das famílias de subtipo, dos 22 isolados, somente 4,5% (1/22) pertencem à família de subtipo IIa, enquanto 95,5% (21/22) dos isolados pertencem à família IId. No que respeita aos subtipos, de forma semelhante verifica-se que estes se distribuem de modo desigual entre os diversos hospedeiros infectados (quadro XIII). A diversidade de subtipos foi mais elevada nos bovinos, ao termos caracterizado cinco subtipos distintos de *C. parvum* pertencentes às duas famílias de subtipo IIa e IId, tendo sido descrito um único subtipo na primeira família e quatro subtipos nesta última. Nos humanos e nos suínos a diversidade genética dos isolados foi mais reduzida, uma vez que apenas foi identificado, em ambos, um único subtipo pertencente à família IId.

Quadro XIII. Distribuição dos subtipos de *C. parvum* nas populações humana e animal

Hospedeiros (n)	Subtipos					
	IIdA21G1a	IIdA22G1	IIdA25G1	IIdA26G1	IIdA27G1	IIaA16G1R1
Humanos (4)	0	4	0	0	0	0
Bovinos (17)	1	2	5	0	8	1
Suínos (1)	0	0	0	1	0	0

Relativamente à prevalência dos diversos subtipos, nos humanos, a caracterização dos isolados foi uniforme, tendo-se verificado que todos os isolados positivos foram caracterizados com o subtipo IIdA22G1 (100%; 4/4). No que respeita aos bovinos, a prevalência dos diversos subtipos caracterizados é bastante heterogênea, verificando-se que entre os cinco subtipos identificados, o predominante foi o IIdA27G1 (47,1%; 8/17), seguido dos subtipos IIdA25G1 (29,4%; 5/17) e IIdA22G1

(11,8%; 2/17). Por sua vez, os subtipos IIdA21G1a e IIdA16G1R1 foram os menos frequentes, tendo sido identificados em apenas um isolado cada (5,9%; 1/17). Relativamente aos suínos, apenas foi possível caracterizar um isolado, o qual foi descrito com o subtipo IIdA26G1 (100%; 1/1). A prevalência dos diversos subtipos caracterizados de acordo com o hospedeiro está representada graficamente na figura 20.

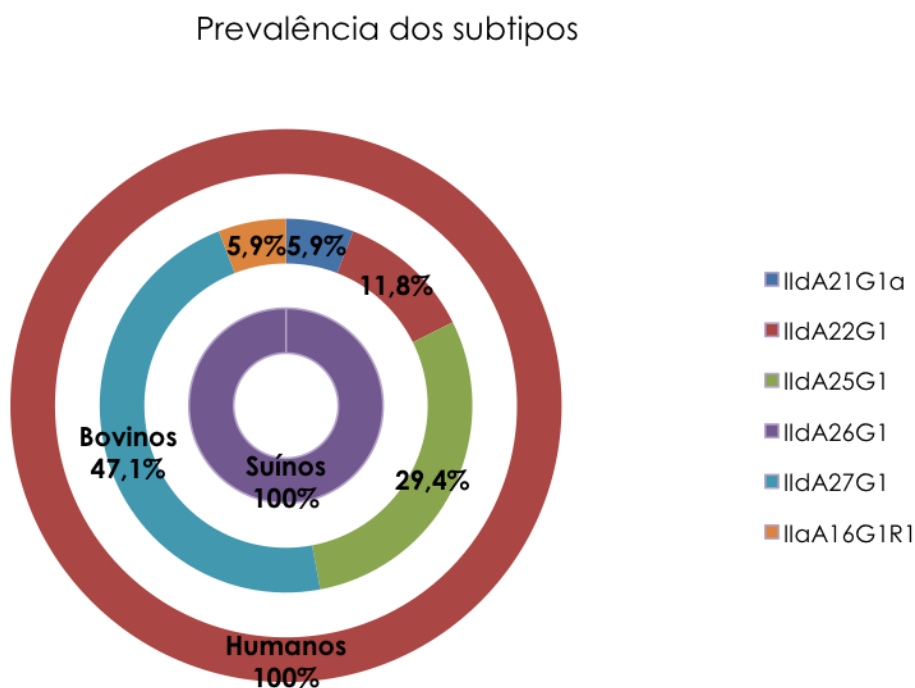


Figura 20. Prevalência dos subtipos de *C. parvum* nas populações humana e animal. População humana (círculo externo), população animal: bovinos (círculo intermédio), e suínos (círculo interno)

Relativamente à distribuição das famílias de subtipo em função dos hospedeiros infectados deste estudo, verifica-se que o único isolado da família IId teve origem num único hospedeiro bovino (100%; 1/1), enquanto os vários isolados da família IId distribuem-se entre os humanos, bovinos e suínos, nomeadamente nos humanos foram caracterizados 19,1% (4/21) dos isolados desta família, enquanto nos bovinos e suínos foram descritos, respectivamente 76,2% (16/21) e 4,76% (1/21) dos isolados. A distribuição das famílias de subtipo em função do hospedeiro encontra-se representada graficamente na figura 21. Por sua vez, a distribuição dos diversos subtipos em função dos diversos hospedeiros infectados neste estudo revela que, o subtipo IIdA22G1 foi o único caracterizado simultaneamente em humanos e bovinos, tendo sido descrito em 66,7% (4/6) dos isolados provenientes dos humanos e em 33,3% (2/6) dos isolados

provenientes dos bovinos. Os restantes subtipos, nomeadamente IIdA21G1a, IIdA25G1, IIdA27G1 e IIdA16G1R1 foram exclusivamente descritos nos bovinos (100%), enquanto o subtipo IIdA26G1, foi o único subtipo identificado em suínos (100%). A distribuição dos diversos subtipos caracterizados neste estudo em função do hospedeiro encontra-se graficamente representada na figura 22.

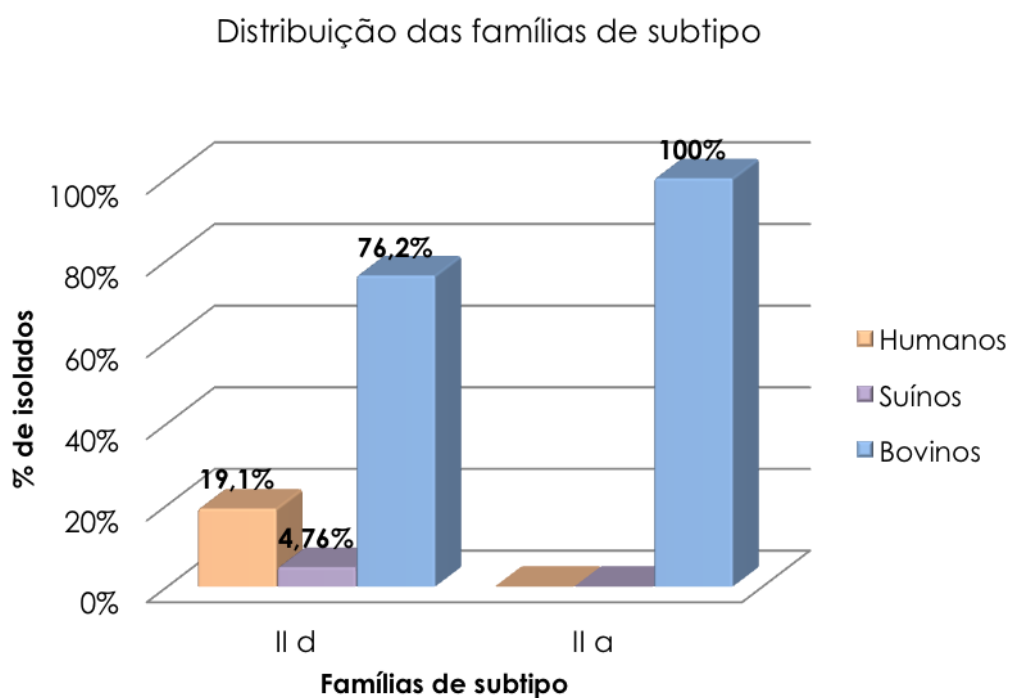


Figura 21. Distribuição das famílias de subtipo de *C. parvum* em função do hospedeiro

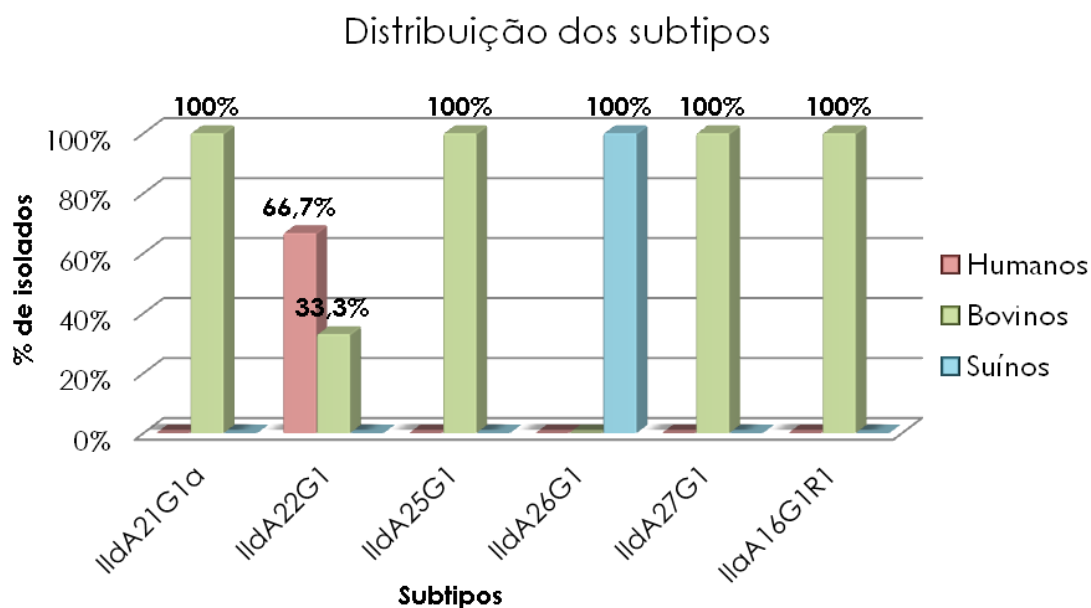


Figura 22. Distribuição dos subtipos de *C. parvum* em função do hospedeiro

Quadro XIV. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais das populações humana e animal

Isolado	Hospedeiro	Idade	Clínica	CP	Amplificação		Espécies/ genótipos	Subtipos
					SSU rRNA	GP60		
RB1	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB2	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA22G1
RB3	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB4	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	+	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA27G1
RB5	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Pos.	Neg.	<i>C. parvum</i>	ND
RB6	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA25G1
RB7	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	+	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA25G1
RB8	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA27G1
RB9	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA21G1a
RB10	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB11	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB12	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA25G1
RB13	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB14	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA27G1
RB15	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	+	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA27G1
RB16	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA27G1
RB17	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	+	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA27G1
RB18	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB19	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA27G1
RB20	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	+	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA16G1R1
RB21	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB22	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA25G1
RB23	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB24	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	++	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA25G1
RB25	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB26	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	+	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA22G1
RB27	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	++	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA27G1
RB28	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RB29	Bovino	≤ 2 meses	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA

Quadro XIV. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais das populações humana e animal – continuação

Isolado	Hospedeiro	Idade	Clínica	CP	Amplificação		Espécies/ genótipos	Subtipos
					SSU rRNA	GP60		
RP1	Suíno	9 semanas	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RP2	Suíno	9 semanas	Diarreia	-	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA26G1
RP3	Suíno	9 semanas	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RP4	Suíno	9 semanas	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RP5	Suíno	9 semanas	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RP6	Suíno	9 semanas	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RP7	Suíno	9 semanas	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RP8	Suíno	9 semanas	Diarreia	+	Neg.	Neg.	ND	ND
RH1	Humano	≤ 12anos	Diarreia	-	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA22G1
RH2	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	+++	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA22G1
RH3	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RH4	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RH5	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RH6	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RH7	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	+++	Pos.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA22G1
RH8	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	++	Neg.	Pos.	<i>C. parvum</i>	IIdA22G1
RH9	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RH10	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA
RH11	Humano	≤ 12 anos	Diarreia	-	Neg.	Neg.	NA	NA

-: ausência de visualização de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no diagnóstico parasitológico.

CP: Carga Parasitária.

Neg: Reacção Negativa.

Pos: Reacção Positiva.

NA: Não Aplicável.

ND: Não Determinado.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1. Considerações gerais

Na Roménia, a escassa informação molecular sobre a população de *Cryptosporidium* spp. disponível tem incidido principalmente em bovinos, verificando-se que a realidade da constituição genética destes protozoários, noutros animais e em humanos residentes neste país é ainda uma incógnita. O presente trabalho permitiu aprofundar esta mesma informação relativamente aos hospedeiros bovinos, assim como acrescentar algumas informações à escassez de dados que existem relativamente a outros hospedeiros, nomeadamente suínos e humanos. Neste trabalho um total de 48 amostras fecais de 48 indivíduos (11 provenientes de humanos, 29 de bovinos e oito de suínos) foram submetidas ao diagnóstico parasitológico e molecular recorrendo a dois *loci*, SSU rRNA e GP60, seguida da caracterização molecular e intra-molecular dos isolados positivos. No geral, a frequência de infecção foi de 36,4% (4/11) nos humanos, 62,1% (18/29) nos bovinos e 25% (2/8) nos suínos. Contudo, uma vez que apenas foi colhida uma amostra fecal por hospedeiro, a verdadeira frequência de infecção deste estudo, à semelhança do que acontece com outros, pode estar subestimada uma vez que a colheita pode ter sido realizada durante o período de excreção intermitente dos oocistos, o que contribuiu para que a infecção nesse hospedeiro fosse considerada negativa (Iqbal *et al.* 1999; Castro-Hermida *et al.* 2002; Santín *et al.* 2004, 2008; Fayer *et al.* 2006, 2007).

Por outro lado, comparando as frequências de infecção obtidas em cada metodologia empregue neste estudo, de uma forma geral, o diagnóstico molecular revelou ser a abordagem mais sensível. O método de diagnóstico de infecção por *Cryptosporidium* spp. pode influenciar a frequência de infecção obtida no estudo, uma vez que os métodos moleculares revelam uma maior sensibilidade e precisão do que os métodos microscópicos (Fayer *et al.* 2000; Santín *et al.* 2008). No nosso estudo, as frequências de infecção obtidas em cada uma das metodologias empregues vão ao encontro destas observações, uma vez que o número de isolados positivos obtidos pela técnica de *nested*-PCR, foi no geral, superior ao obtido pelo diagnóstico parasitológico (ver quadro XI, no capítulo Resultados).

4.2. Frequência de infecção por *Cryptosporidium* spp. nas populações humana e animal

As crianças submetidas a este estudo tinham até 12 anos de idade, e os resultados obtidos revelam uma elevada frequência de criptosporidiose neste grupo (36,4%; 4/11). Este valor deve ser interpretado com cuidado, uma vez que o número total de crianças submetidas a este estudo foi muito reduzido. Um estudo prévio realizado na mesma região em crianças com um mês a seis anos de idade, três das quais seropositivas para VIH, registou uma prevalência ligeiramente mais baixa (14,3%; 5/35) (Mederle *et al.* 2009). Nas crianças, existe um interesse e uma preocupação muito particulares no que respeita à ocorrência desta doença, a qual, nos países desenvolvidos, parece ocorrer sobretudo em creches. Nestes países, os dados epidemiológicos da criptosporidiose na população pediátrica disponíveis são escassos e, na sua maioria, não se encontram actualizados, contudo, a título de exemplo serão referidos alguns trabalhos realizados na Europa, com o principal objectivo de estabelecer uma comparação com a frequência de infecção obtida no nosso estudo. Em França, um estudo epidemiológico realizado em crianças com três a 37 meses de idade que frequentavam creches, registou uma prevalência de infecção de 3,8% (9/235) (Lacroix *et al.* 1987). Estes autores verificaram ainda que todas as crianças infectadas tinham idade inferior a 18 meses (Lacroix *et al.* 1987). Em Espanha, um estudo realizado entre 1988 a 1994, analisou 10.034 amostras fecais provenientes de 4.508 crianças imunocompetentes com idades compreendidas entre um mês a 14 anos, tendo verificado que a prevalência de infecção nesta população foi de 1,93% (87/4508) (Clavel *et al.* 1996). Curiosamente estes autores observaram que a infecção foi mais prevalente no período de Outubro a Março, contudo, apenas em crianças cuja idade estava compreendida entre um a três anos, grupo que obteve a prevalência de infecção mais elevada (6,20%; 50/806) (Clavel *et al.* 1996). Em Itália, a prevalência de criptosporidiose em crianças hospitalizadas com idade inferior a 14 anos, das quais 359 eram imunocompetentes e nove eram seropositivas para VIH, foi de 1,90% (7/368) (Brandonisio *et al.* 1996). Neste estudo, verificou-se que o grupo com dois a três anos de idade obteve a prevalência de infecção mais elevada (4,71%; 4/85) (Brandonisio *et al.* 1996). Salienta-se no entanto que as percentagens referidas nestes últimos trabalhos foram obtidas através de métodos microscópicos, menos sensíveis do que os métodos de biologia molecular a que

recorremos no nosso estudo. Apesar do reduzido número de crianças submetidas ao estudo, a frequência de infecção obtida é muito significativa, semelhante aos valores descritos nos países em desenvolvimento, onde a criptosporidiose é endêmica. Mais concretamente, no Paquistão, a percentagem de infecção em crianças até cinco anos de idade com diarreia foi de 10,3% (49/475) verificando-se que a infecção foi sobretudo prevalente em crianças com idades compreendidas entre 19 e 24 meses (21,8%; 12/55) (Iqbal *et al.* 1999). Na África do Sul a infecção foi prevalente em 24,8% (25/101) em crianças com seis meses a três anos de vida (Leav *et al.* 2002), enquanto no Uganda, a prevalência de criptosporidiose em crianças com idade inferior a cinco anos e com diarreia persistente foi de 31,3% (76/243) (Tumwine *et al.* 2005). Estes autores verificaram adicionalmente que as crianças seropositivas para VIH são mais propensas à infecção (73,6%; 67/91) comparativamente às crianças seronegativas (5,92%; 9/152) (Tumwine *et al.* 2005). Neste estudo, efectuado no distrito de Timis, Roménia, a presença de infecção em quatro das 11 crianças é significativo e, sugere que nesta região, a transmissão de criptosporídeos nesta população ocorre de forma intensa, o que pode trazer implicações graves ao nível da saúde pública, uma vez que as crianças infectadas são importantes fontes de infecção e, eventualmente, responsáveis pela perpetuação da infecção na comunidade. Para além disso, nas crianças, cujo sistema imunológico ainda não está completamente desenvolvido (o sistema imune é considerado completamente desenvolvido a partir dos sete anos de idade), a infecção está associada a subsequentes problemas no desenvolvimento físico, devido à desnutrição e, consequente atraso do crescimento, mas também no desenvolvimento cognitivo (Huang *et al.* 2004). Estas sequelas, embora mais evidentes nas crianças dos países em desenvolvimento (Huang *et al.* 2004), poderão ocorrer em crianças dos países desenvolvidos, caso se encontrem desnutridas ou gravemente imunocomprometidas.

No presente estudo, os vitelos estudados tinham até dois meses de idade, e a elevada frequência de infecção detectada nestes animais (62,1%, 18/29) indica que os criptosporídeos são parasitas ubíquos no gado bovino do distrito de Timis, Roménia. Um estudo prévio realizado na mesma região deste país em bovinos com idades compreendidas entre um a 30 dias corrobora as nossas observações, e embora registe uma prevalência geral de infecção mais baixa (25%; 65/258), verificou que a infecção foi mais prevalente nos vitelos com oito a 14 dias de idade (49%; 32/65) (Imre *et al.*

2011). A prevalência geral de criptosporidiose no gado bovino tem sido mundialmente descrita e diversos estudos referem prevalências semelhantes às que nós descrevemos em vitelos da mesma faixa etária. Um estudo realizado em 65 indústrias leiteiras localizadas no centro de Espanha revelou uma prevalência geral de infecção de 52,3% (114/218) em bovinos com um a 30 dias de idade, tendo-se verificado que os animais com idade compreendida entre oito e 21 dias têm um risco acrescido para a infecção (de la Fuente *et al.* 1999). Na Galiza, Espanha, a percentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. em vitelos com menos de 21 dias de idade foi de 47,9% (404/844) (Castro-Hermida *et al.* 2002). Também em Portugal, um estudo realizado em explorações pecuárias localizadas no Alentejo e Ribatejo registou uma prevalência de criptosporidiose em bovinos jovens e adultos de 23,3% (129/553), e embora essa prevalência seja relativamente baixa, a elevada prevalência de infecção por criptosporídeos ficou evidente em vitelos com oito a 24 dias de idade, nos quais a percentagem de infecção foi de 42,9% (70/163) (Pereira da Fonseca *et al.* 2001). Mais recentemente, a prevalência de infecção em vitelos criados em explorações agrícolas comerciais da Beira Litoral e Entre Douro e Minho foi de 25,4% (74/291) (Mendonça *et al.* 2007). Os nossos resultados são também corroborados por estudos realizados mais recentemente em diversas áreas geográficas, tendo em conta a elevada prevalência de infecção por *Cryptosporidium* spp. registada em vitelos com até dois meses de idade, nomeadamente nos EUA (41%; 161/393), na Sérvia e Montenegro (60,2%; 62/103), na Hungria (49,4%; 39/79), e no Reino Unido (28%; 60/215) (Santín *et al.* 2004; Misic & Abe, 2007; Plutzer & Karanis, 2007; Brook *et al.* 2009). Salienta-se no entanto, que alguns destes estudos foram realizados apenas com base na microscopia e, ainda assim, as percentagens de infecção nesta população foram idênticas à obtida no nosso estudo. Por outro lado, ainda que o nosso estudo tenha incidido somente em vitelos cuja idade constitui, por si só, um elevado risco para a infecção por criptosporídeos, o claro predomínio da criptosporidiose nestes animais é preocupante, uma vez que as perdas económicas associadas a esta doença nestes animais são elevadas, e dizem respeito à mortalidade e ao atraso do crescimento, à necessidade de fármacos, soluções de electrólitos e medidas de higiene adequadas (de Graaf *et al.* 1999). A infecção destes animais pode ter sido adquirida em diversos contextos, nomeadamente a partir de resíduos fecais presentes no ambiente, na mãe, ou devido ao contacto físico com outros

vitelos infectados ou superfícies contaminadas, salientando-se que os vectores mecânicos, como os tratadores e os artrópodes, também poderão ter um importante papel na infecção dos bovinos (Huetink *et al.* 2001; Santín *et al.* 2008). Por outro lado, a elevada frequência de infecção detectada nos vitelos pode trazer também implicações graves ao nível da saúde pública, uma vez que estes animais constituem focos activos na transmissão, directa ou indirecta, de espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* a outros animais e, eventualmente, aos humanos.

Os suínos submetidos a este estudo tinham nove semanas de idade, tendo sido encontrada uma frequência de infecção de 25% (2/8). Embora o número total de suínos submetidos a este estudo tenha sido bastante reduzido, os resultados sugerem que a susceptibilidade destes animais à infecção por *Cryptosporidium* spp. é bastante elevada. A infecção natural dos suínos por criptosporídeos tem sido descrita a nível mundial, e diversos estudos realizados em diversas áreas geográficas, referem prevalências semelhantes às que nós descrevemos em suínos da mesma faixa etária. No Japão, um estudo detectou uma elevada percentagem de infecção em suínos com um a três meses de idade (33,2%; 77/232) (Izumiyama *et al.* 2001), tendo sido descritos valores idênticos na República Checa em suínos desmamados, com idade superior a seis semanas (24,1%; 201/835) (Vítovec *et al.* 2006), e em suínos com quatro semanas a seis meses de idade da Austrália (32,7%; 51/156) (Johnson *et al.* 2008). A elevada frequência de infecção detectada no nosso estudo e naqueles trabalhos, vai ao encontro das observações realizadas por Ryan *et al.* (2003), que demonstraram que, contrariamente aos vitelos cuja infecção é sobretudo prevalente na segunda semana de vida (de la Fuente *et al.* 1999; Santín *et al.* 2004, 2008), nos suínos a infecção ocorre nos animais com idade mais avançada, ao verificarem que a percentagem de infecção foi mais frequente em suínos com cinco a oito semanas de idade, do que naqueles até cinco semanas de vida. No entanto, comparativamente aos nossos resultados e a estes últimos trabalhos, têm sido descritas prevalências de infecção mais baixas noutras regiões, nomeadamente em Espanha, onde a percentagem de infecção em suínos com dois a seis meses de idade foi apenas de 11,9% (5/42) (Suárez-Luengas *et al.* 2007). As políticas de gestão adoptadas por estas explorações pecuárias, em particular medidas de higiene adequadas, poderão eventualmente ter contribuído para a obtenção de uma percentagem de infeção nos suínos mais reduzida neste último país. A suinicultura é

uma actividade económica muito relevante em diversas explorações pecuárias e a infecção dos suínos por *Cryptosporidium* spp. conduz a importantes perdas económicas. Por outro lado, a infecção destes animais, nomeadamente naqueles com mais de cinco semanas de idade, traz importantes implicações epidemiológicas para a saúde pública, uma vez que estes poderão actuar como reservatórios destes parasitas e, consequentemente, ter um papel activo na transmissão, directa ou indirecta de criptosporídeos aos animais e humanos. Para além disso, tendo em conta que geralmente há uma elevada concentração de matéria fecal no lugar onde estes animais são criados, a ausência de medidas higiénicas adequadas e direccionadas facilita a dispersão dos oocistos para o ambiente, incluindo para cursos de água, sobretudo quando chove, promovendo indirectamente a sua transmissão (Xiao *et al.* 2006).

4.3. Espécies de *Cryptosporidium* nas populações humana e animal

Neste estudo, todos os isolados provenientes das crianças do distrito de Timis, Roménia, foram identificados como *C. parvum*. Os nossos resultados estão de acordo com diversos trabalhos realizados na Europa, onde se observa um maior número de infecções causadas por *C. parvum* comparativamente a *C. hominis*. Nomeadamente na República Checa, à semelhança do nosso estudo, *C. parvum* foi a única espécie identificada em crianças imunocompetentes com cinco meses a oito anos de idade (100%; 9/9) (Hajdušek *et al.* 2004). Também na Eslovénia, a infecção por *C. parvum* foi prevalente em 89,5% (17/19) em crianças imunocompetentes com um a 12 anos de idade, tendo sido identificada a espécie *C. hominis* em apenas 5,26% (1/19) dos isolados (Šoba *et al.* 2006). Outros estudos, embora alguns deles não tenham incidido exclusivamente na população pediátrica, ou não tenham incidido de todo, demonstram que a maioria das infecções no continente europeu são sobretudo devidas a *C. parvum*. Mais concretamente, a infecção por esta espécie varia entre 56,1% (1354/2414) a 61,5% (1049/1705) em crianças e adultos do Reino Unido, 89,7% (35/39) em crianças e adultos da Irlanda do Norte, 50,9% (29/57) em crianças e adultos imunocompetentes e imunocomprometidos de França, e 53,8% (7/13) em seropositivos para VIH da Suíça, o que contrasta com os reduzidos valores de prevalência obtidos para a espécie *C. hominis* nestes mesmos estudos, nomeadamente 37,8% (645/1705) a 41,7% (1005/2414) no Reino Unido, 10,3% (4/39) na Irlanda do Norte, 31,6% (18/57) na França, e 15,4% (2/13) na Suíça (McLauchlin *et al.* 2000; Morgan *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2001; Lowery *et al.* 2001; Leoni *et al.* 2006). A ausência de infecção por *C. hominis* neste estudo, está assim de acordo com o padrão epidemiológico desta espécie, uma vez que na Europa, esta é responsável por um reduzido número de infecções, enquanto nos restantes continentes, a infecção por esta espécie é prevalente. Estudos executados em vários países em desenvolvimento e tendo a população infantil como principal alvo de estudo, registam um maior número de infecções atribuídas à espécie *C. hominis*, nomeadamente 78,8% (67/85) no Peru, 81,0% (47/58) na Índia, 73,7% (56/76) no Uganda, 76,2% (16/21) na África do Sul, e 95,3% (41/43) no Malawi, enquanto a espécie *C. parvum* é responsável por um restrito número de infecções, mais concretamente 9,41% (8/85) no Peru, 12,1% (7/58) na Índia, 18,4% (14/76) no Uganda,

23,8% (5/21) na África do Sul, e 4,65% (2/43) no Malawi (Xiao *et al.* 2001a; Leav *et al.* 2002; Peng *et al.* 2003; Tumwine *et al.* 2005; Ajjampur *et al.* 2007).

Por outro lado, para além de *C. parvum* e de *C. hominis*, nos seres humanos, a infecção tem sido associada com várias outras espécies zoonóticas, nomeadamente, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* e *C. muris*. Os trabalhos realizados nos países desenvolvidos observam que a infecção por estas espécies ocorre sobretudo em indivíduos imunocomprometidos (Morgan *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2001), embora já tenham sido descritas em imunocompetentes (Leoni *et al.* 2006). No entanto, na população infantil da Roménia submetida a este estudo, estas espécies não foram encontradas, o que está maioritariamente de acordo com estes últimos trabalhos referidos. De facto, estas espécies menos usuais são mais frequentemente implicadas como agentes etiológicos de doença nas crianças dos países em desenvolvimento (Xiao *et al.* 2001a; Tumwine *et al.* 2005; Ajjampur *et al.* 2007).

Durante o estudo, relativamente às crianças apenas foi fornecida a informação, de que, no geral, estas tinham até 12 anos de idade e, por razões de protecção de privacidade, não foram disponibilizadas informações acerca da idade precisa de cada criança, do seu estado imunológico ou do contexto em que a infecção foi adquirida. A ausência destas informações impossibilita-nos de compreender a razão de apenas termos identificado a espécie *C. parvum*. Ainda assim, de uma forma geral, os resultados relativos à genotipagem dos isolados eram esperados, tendo em conta o elevado número de infecções atribuídas a *C. parvum*, a espécie zoonótica mais prevalente nos países europeus. O predomínio da infecção por *C. parvum* na população humana estudada sugere que a transmissão ocorre de forma zoonótica, contribuindo para o efeito, a existência de uma grande diversidade de reservatórios zoonóticos, como o gado doméstico e os animais selvagens (McLauchlin *et al.* 2000; Hunter & Thompson, 2005), os quais parecem estar na origem do elevado número de infecções atribuídas a esta espécie. No Reino Unido, McLauchlin *et al.* (2000) demonstraram que a infecção por *C. parvum* em alguns dos casos esporádicos está associada a visitas a explorações pecuárias e ao contacto com o gado doméstico e, a subsequente falta de acesso a estes animais, domésticos e selvagens, como referem Hunter *et al.* (2003) parece explicar a diminuição do número de infecções humanas atribuídas a *C. parvum*. Estas observações foram corroboradas por um estudo caso controlo realizado na Inglaterra e País de Gales,

onde Hunter *et al.* (2004) mostraram que o contacto com o gado doméstico constitui o principal factor de risco associado à infecção por *C. parvum*, ao demonstrarem a existência de uma associação estatisticamente significativa entre a infecção por *C. parvum* e o contacto com estes animais. Estas observações são consistentes com os nossos resultados e com os estudos de genotipagem entretanto realizados no gado doméstico da Roménia, uma vez que estes animais apresentam uma elevada percentagem de infecção por *C. parvum* (Imre *et al.* 2010, 2011, 2012 comunicação pessoal). Os nossos resultados são também consistentes com a distribuição sazonal desta espécie, uma vez que, o pico de infecção dos humanos por *C. parvum* ocorre na primavera, devido ao elevado número de nascimentos de bovinos e ovinos, e à propagação de fertilizantes de origem animal nos terrenos agrícolas (McLauchlin *et al.* 2000; Learmonth *et al.* 2004), e como tal, o número de oocistos excretados pelos animais infectados, ou os dispersos por intermédio dos fertilizantes no ambiente durante o período primaveril, provavelmente ainda era muito elevado em Julho. Os nossos resultados poderão também reflectir a ruralidade da região onde as crianças viviam, uma vez que a infecção por esta espécie nos humanos tem sido observada em maior proporção nas zonas rurais do que em zonas urbanas (Learmonth *et al.* 2004). Apesar da transmissão zoonótica parecer ser a principal forma de transmissão no distrito de Timis, Roménia, salienta-se que a infecção por *C. parvum* também poderá ter origem antroponótica, ao constatar-se a existência de subtipos de *C. parvum* que até à data só ainda foram caracterizados em humanos e, como tal, a determinação do verdadeiro modo de transmissão presente nesta região está dependente dos resultados da subgenotipagem, como descrito mais adiante.

Nos vitelos, a análise das sequências de todos os isolados responsáveis pela infecção identificou apenas a espécie *C. parvum*. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios realizados na mesma região, onde a totalidade dos isolados positivos foi identificada como pertencendo unicamente a esta espécie (Imre *et al.* 2010, 2011). Diversos estudos de genotipagem de *Cryptosporidium* spp. realizados em vitelos até dois meses de idade corroboram os nossos resultados. Nomeadamente no Canadá, no Reino Unido, na Alemanha e na Sérvia e Montenegro, à semelhança do que foi descrito na Roménia, *C. parvum* foi a única espécie identificada em vitelos com idade inferior a dois meses (McLauchlin *et al.* 2000; Trotz-Williams *et al.* 2006; Misic & Abe, 2007;

Broglia *et al.* 2008). Os nossos resultados são também corroborados por Santín *et al.* (2004), os quais partindo de um estudo longitudinal realizado em 15 explorações leiteiras localizadas nos EUA verificaram que a espécie *C. parvum* foi claramente predominante em vitelos até dois meses de idade, tendo sido atribuída a esta espécie 85% (138/161) das infecções nestes animais. Estes autores observaram ainda que até às duas semanas de idade a infecção nos vitelos foi somente da responsabilidade de *C. parvum*, sendo o mesmo responsável por 60 a 90% das infecções nos restantes vitelos desta faixa etária (Santín *et al.* 2004). Um segundo estudo realizado nos EUA identificou, em vitelos da mesma faixa etária, uma elevada prevalência de infecção atribuída a *C. parvum*, principalmente entre a primeira (80%; 24/30) e a segunda semana de idade (96,7%; 29/30) (Santín *et al.* 2008). Nos vitelos da Hungria, Eslovénia, Bélgica e mais recentemente do Reino Unido, as infecções, à semelhança do que aconteceu nestes últimos estudos, foram também maioritariamente atribuídas à espécie *C. parvum* (Geurden *et al.* 2007; Plutzer & Karanis, 2007; Soba & Logar, 2008; Brook *et al.* 2009). Actualmente sabe-se que os bovinos são naturalmente infectados, para além de *C. parvum*, por mais três espécies, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni*, sendo a infecção por cada uma destas espécies relacionada com a idade dos mesmos. Tendo em conta a idade dos vitelos submetidos ao presente estudo era esperado, no entanto, que para além de *C. parvum*, fossem identificadas, embora em menor proporção, estas últimas espécies que naturalmente estão presentes na infecção de vitelos jovens. Nomeadamente, Santín *et al.* (2004), identificaram também em vitelos até dois meses de idade as espécies *C. bovis* (9%; 14/161), *C. ryanae* (5%; 8/161) e *C. andersoni* (1%; 1/161), tendo sido estes resultados corroborados por um segundo estudo, no qual, para além de *C. parvum*, a espécie *C. bovis* começou a ser identificada a partir da quarta semana de idade dos vitelos (Santín *et al.* 2008). Outros estudos realizados em várias regiões distintas vão ao encontro destas observações, uma vez que para além de *C. parvum*, foram identificadas outras espécies associadas a vitelos desta faixa etária, nomeadamente nos vitelos da Hungria, Eslovénia, Bélgica e Reino Unido, um reduzido número de infecções foram atribuídas às espécies *C. bovis* e/ou *C. ryanae* (Geurden *et al.* 2007; Plutzer & Karanis, 2007; Soba & Logar, 2008; Brook *et al.* 2009). Contrariamente aos nossos resultados e aos diversos estudos acima mencionados, importa referir que o predomínio da infecção por *C. parvum* em vitelos jovens não se

verifica em algumas regiões e, nomeadamente na Suécia, um estudo recente identificou em vitelos com um a 62 dias de vida *C. bovis* como a espécie mais prevalente (74,0%; 54/73), seguida de *C. parvum* (20,5%; 15/73) e *C. ryanae* (5,48%; 4/73) (Silverlås *et al.* 2010). Este último estudo vai ao encontro das observações realizadas por Feng *et al.* (2007), os quais sugerem que a infecção por *C. bovis* e *C. ryanae* ocorre também em idade jovem nestes animais, contudo, estas infecções são camufladas devido aos elevados níveis de infecção causados por *C. parvum*.

Durante o estudo, relativamente aos vitelos apenas foi fornecida a informação que no geral, estes animais tinham até dois meses de idade, não tendo sido disponibilizadas informações acerca da(s) exploração(ões) pecuária(s) onde as amostras foram colhidas ou das infra-estruturas onde os animais permaneciam, por razões de protecção de privacidade destas. A elevada prevalência de *C. parvum* detectada neste estudo é consistente com a idade dos vitelos, mas ainda assim, o facto de desconhecermos se o número de vitelos que tinha mais de quatro semanas de idade submetidos ao estudo foi significativo, impossibilita-nos de compreender a razão de apenas termos identificado uma única espécie em vitelos enquadrados numa faixa etária, onde normalmente outras espécies também são identificadas. À semelhança do que está descrito noutros países, a elevada prevalência desta espécie em vitelos até dois meses de idade atribui aos mesmos um importante papel como principais reservatórios da espécie zoonótica mais importante, *C. parvum*, mas também como importantes fontes de infecção para outros animais e humanos. O elevado número de oocistos excretados pelos vitelos infectados contribui para a perpetuação de ciclos de infecção em animais que partilham o mesmo espaço físico, e para a contaminação do ambiente e consequente infecção de outros animais e humanos, directa ou indirectamente.

Relativamente aos suínos, apenas foi possível caracterizar um único isolado, tendo sido identificada a espécie *C. parvum*. A caracterização de apenas um isolado não é representativa do padrão epidemiológico da infecção por *Cryptosporidium* spp. nos suínos do distrito de Timis, Roménia, e como tal, faremos apenas algumas considerações comparativamente a outros trabalhos. Na Austrália, Ryan *et al.* (2003) caracterizaram nos suínos até oito semanas de idade a espécie *C. suis* e o genótipo *Cryptosporidium* porco II. Estes resultados foram corroborados por outros estudos, nomeadamente num segundo trabalho realizado mais recentemente na Austrália

(Johnson *et al.* 2008). Neste último trabalho, os autores verificaram ainda que o genótipo *Cryptosporidium* porco II foi o mais prevalente (72,7%; 32/44), tendo sido descrito apenas nos suínos desmamados com quatro semanas a seis meses de idade, seguido de *C. suis* (27,3%; 12/44), o qual foi caracterizado nos suínos não desmamados e desmamados (Johnson *et al.* 2008). Na Espanha, *C. suis* e o genótipo *Cryptosporidium* porco II foram também caracterizados nos suínos desmamados, com mais de um mês de idade, verificando-se que este último foi também o mais prevalente nesta população (61,5%; 16/26) (Suárez-Luengas *et al.* 2007), enquanto na República Checa, apenas foi caracterizada a espécie *C. suis* nos suínos não desmamados, até cinco semanas de idade, e desmamados, com mais de seis semanas de idade (Vítovec *et al.* 2006). Também na Irlanda do Norte foram identificadas a espécie *C. suis* e o genótipo *Cryptosporidium* porco II, tendo sido também descrita a espécie *C. muris* (Xiao *et al.* 2006). No entanto, estes autores referem que este isolado pode ter tido origem num roedor e não necessariamente num suíno infectado (Xiao *et al.* 2006). Alguns autores verificaram ainda que, contrariamente aos vitelos, nos quais parece existir uma associação entre a idade e a espécie envolvida na infecção (Santín *et al.* 2004, 2008), nos suínos esta premissa parece não verificar-se (Ryan *et al.* 2003; Xiao *et al.* 2006). Mais raramente, a infecção de suínos por *C. parvum* tem sido descrita em suínos da Irlanda (Xiao, 2010) e em dois suínos fêmea da República Checa (Kváč *et al.* 2009). A detecção generalizada de ambos os genótipos nos suínos em diversas áreas geográficas e a ausência simultânea de infecção por *C. parvum*, sugere que estes animais não são importantes reservatórios zoonóticos, apesar de *C. suis* já ter sido identificado num indivíduo imunocompetente (Leoni *et al.* 2006).

Tanto quanto sabemos, este foi o primeiro estudo de genotipagem de espécies de *Cryptosporidium* em suínos do distrito de Timis, Roménia, e à semelhança da população humana e bovina deste estudo, relativamente aos suínos apenas foi fornecida a sua informação demográfica. No entanto, a identificação de *C. parvum* num dos nossos isolados positivos sugere que no distrito de Timis, Roménia, os suínos podem eventualmente ter um papel na transmissão deste parasita a outros animais e humanos. Fica por determinar se a infecção dos suínos por *C. parvum* foi uma situação esporádica, devido à transmissão cruzada desta espécie dos vitelos infectados para os suínos, até porque como já foi referido, na altura da colheita das amostras, o número de

vitelos infectados e o número de oocistos presentes no ambiente provavelmente ainda era muito elevado, ou se constitui um padrão epidemiológico relativamente estável nos suínos desta região.

4.4. Subtipos de *C. parvum* nas populações humana e animal

Relativamente à subgenotipagem, os dados obtidos neste estudo com a amplificação do gene GP60 revelam a existência de alguma diversidade genética nos espécimes de *C. parvum*, detectados a partir dos isolados de origem humana, bovina e suína. No geral, os isolados de *C. parvum* deste estudo distribuem-se por duas famílias de subtipo, Ila e IId, e por seis subtipos, nomeadamente IlaA16G1R1, IIdA21G1a, IIdA22G1, IIdA25G1, IIdA26G1 e IIdA27G1, verificando-se que a maior diversidade de subtipos pertence à família de subtipo IId. Todos os subtipos foram somente identificados em bovinos, à excepção do subtipo IIdA22G1, o qual foi identificado em bovinos e humanos, e do subtipo IIdA26G1, o qual foi identificado apenas numa amostra suína.

Neste estudo, a família de subtipo Ila só foi descrita, no geral, num único isolado de *C. parvum* (4,5%; 1/22) tendo sido caracterizado o subtipo IlaA16G1R1 num isolado de origem bovina (5,9%; 1/17). Estudos prévios realizados na Roménia não corroboram os nossos resultados, tendo em conta que nestes estudos, a família de subtipo Ila é a mais frequentemente implicada na criptosporidiose bovina desta região (Imre *et al.* 2010, 2011). Para além disso, e apesar do subtipo caracterizado neste estudo já ter sido previamente descrito em bovinos do distrito de Timis, Roménia (38,5%; 5/16), o subtipo mais frequentemente implicado na criptosporidiose bovina desta região é o IlaA15G2R1 (61,5%; 8/13) (Imre *et al.* 2011). À semelhança do que está descrito na Roménia, noutros estudos epidemiológicos realizados em diversas áreas geográficas, o subtipo IlaA15G2R1 tem sido o mais frequentemente descrito na infecção dos bovinos (Xiao, 2010), nomeadamente nos EUA (77,1%; 135/175), tendo sido o único subtipo identificado num segundo estudo deste país (100%, 91/91), mas também no Canadá (27,8%; 10/36), no Reino Unido (68,6%; 35/51), na Alemanha (81,1%; 43/53), na Bélgica (93,3%; 84/90), na Holanda (69%; 89/129), e na Eslovénia (60%; 27/45) (Trotz-Williams *et al.* 2006; Xiao *et al.* 2007; Geurden *et al.* 2007; Santín *et al.* 2008; Wielinga *et al.* 2008; Soba & Logar, 2008; Broglia *et al.* 2008; Brook *et al.* 2009). Por outro lado, e apesar de apenas termos identificado o subtipo IlaA16G1R1 num único isolado, a sua caracterização está de acordo com a sua distribuição geográfica. Nomeadamente em países vizinhos da Roménia, este subtipo é predominante, sendo responsável por uma grande percentagem de infecção nos bovinos da Hungria (71,4%;

15/21) e da Sérvia e Montenegro (33,3%; 6/18) (Plutzer & Karanis, 2007; Misic & Abe, 2007), tendo sido também descrito, embora em menor proporção, em bovinos da Eslovénia (13,3%; 6/45) (Soba & Logar, 2008). Contrariamente a estes últimos estudos, noutros países geograficamente mais distanciados, este subtipo apenas tem sido descrito ocasionalmente, nomeadamente em bovinos da República Checa (n=1), da Alemanha (n=1), da Suécia (n=1), da Holanda (n=1), e do Canadá (n=4) (Trotz-Williams *et al.* 2006; Broglia *et al.* 2008; Wielinga *et al.* 2008; Ondráčková *et al.* 2009; Silverlås *et al.* 2010). Para além dos bovinos, este subtipo já foi também caracterizado em isolados ovinos da Roménia (Imre, 2012 comunicação pessoal) e em dois isolados suínos da República Checa (Kvác *et al.* 2009). Comparativamente a estes trabalhos, os resultados do nosso estudo são invulgares, uma vez que, a reduzida prevalência da família de subtipo IIa neste trabalho, foi acompanhada pela ausência do subtipo frequentemente implicado na criptosporidiose bovina, IIaA15G2R1. Contudo, a presença do subtipo IIaA16G1R1, apesar de neste estudo ter sido identificado somente num único isolado bovino, está de acordo com a sua distribuição geográfica, sugerindo que na Roménia, na Hungria e na Sérvia e Montenegro, este subtipo tem um importante papel enquanto agente etiológico da criptosporidiose bovina nestes países (Plutzer & Karanis, 2007; Misic & Abe, 2007; Imre *et al.* 2010, 2011). Para além dos bovinos, este subtipo já foi descrito, embora num reduzido número de isolados, em humanos da Eslovénia (n=2) (Soba & Logar, 2008) e dos EUA (n=1) (Feltus *et al.* 2006), sugerindo desta forma, que a sua presença constitui um risco para a saúde pública devido ao seu potencial zoonótico.

Neste estudo, comparativamente à família de subtipo anterior, curiosamente a família de subtipo IId foi a mais comum ao ser descrita na maioria das infecções, em humanos e em animais (95,5%; 21/22), mas também aquela que demonstrou maior diversidade genética, tendo sido caracterizados cinco subtipos desta família. O subtipo IIdA21G1a, tanto quanto sabemos, caracterizado pela primeira vez em vitelos do distrito de Timis, Roménia, foi um dos subtipos menos frequente da família de subtipo IId, tendo sido descrito num único isolado de origem bovina (5,9%; 1/17). À semelhança do nosso estudo, noutros estudos de subgenotipagem, a caracterização deste subtipo ocorre muito raramente, tendo sido descrito previamente num único isolado de origem ovina em Espanha (Quílez *et al.* 2008). Em Portugal, este subtipo já foi

caracterizado também num isolado de origem ovina, tendo sido descrito adicionalmente em dois isolados de doentes seropositivos para VIH (Alves *et al.* 2006). O carácter zoonótico deste subtipo ficou evidente mais recentemente, ao ser caracterizado num isolado proveniente de uma criança do Irão (Nazemalhosseini-Mojarad *et al.* 2011). A infecção de várias espécies de animais pelo subtipo IIdA21G1, ainda que num reduzido número de infecções, sugere que os bovinos e os ovinos, poderão eventualmente contribuir para a existência de um reservatório zoonótico, o que conduz a importantes implicações epidemiológicas ao nível da saúde pública devido ao seu potencial zoonótico.

No que diz respeito ao subtipo IIdA22G1, este foi descrito em dois isolados de origem bovina (11,8%; 2/17), contudo, foi o único subtipo caracterizado nos isolados de origem humana (100%; 4/4). Tanto quanto sabemos, este subtipo ainda não foi previamente caracterizado em bovinos nem em humanos do distrito de Timis, Roménia, tendo em conta que este será o primeiro estudo de genotipagem/subgenotipagem de *Cryptosporidium* spp. em crianças desta região. A caracterização do subtipo IIdA22G1 é pouco frequente em vitelos, tendo sido descrito apenas em alguns países europeus, como se pode observar no quadro XV, nomeadamente num único isolado bovino da Hungria, (1/21), da Alemanha (1/53), da Bélgica (1/90) e da Suécia (1/13) (Geurden *et al.* 2007; Plutzer & Karanis, 2007; Broglia *et al.* 2008; Silverlås *et al.* 2010). Os nossos resultados são coincidentes com estes estudos, tendo em conta que à semelhança destes, este subtipo foi descrito num reduzido número de isolados bovinos. Para além do gado bovino, este subtipo já foi também descrito em pequenos ruminantes, nomeadamente em dois isolados ovinos de Espanha (Quílez *et al.* 2008). Por outro lado, no nosso estudo, este subtipo foi ainda o único responsável pelas infecções nos humanos. Comparativamente a outros estudos de genotipagem na população humana, o subtipo IIdA22G1 já foi também descrito num doente seropositivo para VIH de Portugal (Alves *et al.* 2006) e num outro indivíduo do Reino Unido (Chalmers *et al.* 2011). A infecção de várias espécies de animais pelo subtipo IIdA22G1, ainda que num reduzido número de casos, sugere que tanto os bovinos como os ovinos poderão contribuir para a existência de um importante reservatório zoonótico deste subtipo. Estas observações sugerem a existência de implicações epidemiológicas ao nível da saúde pública devido ao seu potencial zoonótico, principalmente no distrito de Timis, Roménia, onde este

subtipo foi predominante nas crianças. Por outro lado, os resultados da análise filogenética do gene GP60 (ver figura 19, no capítulo Resultados) são bastante curiosos, uma vez que revelou a existência dentro deste subtipo, de dois tipos de sequências geneticamente distintos. Um deles foi descrito em três isolados humanos (RH1, RH2 e RH7) e, apesar de estar filogeneticamente próximo a isolados caracterizados em ovinos de Espanha (número de acesso do *GenBank*: EU549715) e bovinos da Suécia (número de acesso do *GenBank*: FJ917374), o seu potencial zoonótico levanta algumas dúvidas, uma vez que os nossos isolados são geneticamente diferentes destes, devido à existência de um polimorfismo na região 3' do gene GP60. Também o facto de no nosso estudo este tipo de sequência apenas ter sido descrito em humanos, levanta a hipótese deste ter sido transmitido de modo antropológico. O segundo tipo de sequência, por sua vez, foi descrito num isolado humano (RH8) e em dois isolados bovinos (RB2 e RB26) e, neste caso, o seu potencial zoonótico é mais evidente, ao ter sido caracterizado em ambos os hospedeiros, humano e bovino.

O subtipo IIdA25G1, tanto quanto sabemos caracterizado pela primeira vez em vitelos desta região, foi descrito em cinco isolados de origem bovina (29,4%; 5/17). Este subtipo foi descrito recentemente, pela primeira vez, em dois isolados caprinos de Espanha (Quílez *et al.* 2008) e, até à data, que seja do nosso conhecimento, não foi entretanto descrito em mais nenhum hospedeiro. Portanto, este será o segundo estudo que caracteriza este subtipo, contudo o primeiro que o descreve em bovinos. Devido ao reduzido número de estudos, o carácter epidemiológico deste subtipo é ainda uma incógnita, ainda assim, o facto de já ter sido previamente descrito em pequenos ruminantes de Espanha e, no nosso estudo em vitelos, sugere que estes possam ser potenciais reservatórios com um papel na transmissão deste subtipo a outros animais. Por outro lado, tendo em conta que ainda não foi descrito previamente em humanos, o seu potencial zoonótico ainda está por determinar.

O subtipo IIdA26G1 foi caracterizado apenas no único isolado de origem suína (100%; 1/1). Noutros estudos de genotipagem, este subtipo tem sido descrito muito raramente, e tanto quanto sabemos, ainda não foi previamente descrito em suínos, ou até mesmo em bovinos. À semelhança do subtipo IIdA25G1, o subtipo IIdA26G1 já foi descrito em três isolados caprinos de Espanha (Quílez *et al.* 2008), tendo sido descrito mais recentemente num único isolado proveniente de uma criança do Irão

(Nazemalhosseini-Mojarad *et al.* 2011). Os dados epidemiológicos deste subtipo são ainda muito escassos, contudo, a infecção de caprinos e suínos por este subtipo sugere que estes possam actuar como reservatórios zoonóticos, com implicações epidemiológicas ao nível da saúde pública devido ao seu potencial zoonótico.

O subtipo IIdA27G1 revelou ser o mais frequente no nosso estudo ao ser descrito em oito isolados de origem bovina (47,1%; 8/17). Este é um subtipo novo, identificado pela primeira vez no nosso estudo. Tendo em conta o elevado número de infecções, os nossos resultados revelam que os bovinos são muito susceptíveis à infecção por este subtipo, e sugere desta forma que estes animais possam constituir o seu principal reservatório. Para além disso, uma vez que neste estudo não foi descrito em nenhum isolado de origem humana, o seu potencial zoonótico ainda está por determinar.

Os resultados obtidos neste estudo são invulgares e parecem demonstrar a existência de um padrão epidemiológico diferente de outros países, inclusive no próprio distrito de Timis, Roménia, tendo em conta que a distribuição de ambas as famílias de subtipo zoonóticas, IId e IId, neste estudo não é coincidente com a abundante literatura. O subtipo IIdA16G1R1 pelo facto de ter sido descrito num único isolado de origem bovina, e de ser o subtipo mais frequente em países contíguos à Roménia, como a Hungria e a Sérvia e Montenegro (Plutzer & Karanis, 2007; Misic & Abe, 2007), sugere uma provável transmissão cruzada entre bovinos destes países, nomeadamente através da contaminação ambiental, que em associação com a água pluvial promove a deslocação de oocistos, facilitando desta forma a circulação deste subtipo entre bovinos destes países. Por outro lado, observámos alguma diversidade genética na família de subtipo IId. Curiosamente, alguns dos subtipos têm sido encontrados apenas ocasionalmente em pequenos ruminantes (Alves *et al.* 2006; Quílez *et al.* 2008), à excepção do subtipo IIdA22G1, que também tem sido implicado ocasionalmente na criptosporidiose bovina (Geurden *et al.* 2007; Plutzer & Karanis, 2007; Broglia *et al.* 2008; Silverlås *et al.* 2010). A elevada prevalência e diversidade genética de subtipos da família IId em pequenos ruminantes de Espanha, levou os autores a sugerir a existência de uma forte adaptação desta família a estes animais (Quílez *et al.* 2008). Contudo, e apesar de na Roménia a família de subtipo IId também ser descrita mais frequentemente em isolados de origem ovina, tendo sido já descritos os subtipos IIdA20G1, IIdA24G1 e

IIdA22G2R1 (Imre *et al.* 2010, 2012 comunicação pessoal), os resultados do nosso estudo, sugerem que a família de subtipo IId também poderá estar muito bem adaptada aos bovinos e, como tal, estes últimos poderão constituir um importante reservatório zoonótico de subtipos desta família.

Alguns destes subtipos, nomeadamente IIdA16G1R1, IIdA21G1a, IIdA22G1 e IIdA26G1, para além de terem sido identificados em animais neste e noutros estudos realizados em diversas áreas geográficas, já foram também descritos previamente em humanos e, como tal, devem ser considerados subtipos zoonóticos. Destes, tem particular destaque o subtipo IIdA22G1, o qual parece ter um importante papel na criptosporidiose humana no distrito de Timis, Roménia, ao ser o único subtipo descrito nas crianças desta região até ao momento. Os nossos resultados sugerem ainda que a infecção dos suínos neste estudo muito provavelmente, ocorreu devido à transmissão cruzada de famílias de subtipo de *C. parvum* entre bovinos e suínos. Relativamente aos subtipos IIdA25G1 e IIdA27G1, o seu potencial zoonótico necessita de ser esclarecido com mais estudos epidemiológicos.

Também o facto de termos identificado polimorfismos em todas as sequências nucleotídicas dos isolados da família de subtipo IId, comparativamente às sequências dos isolados de referência do *GenBank*, incita à realização de mais estudos. Estes polimorfismos poderão eventualmente influenciar algumas características biológicas dos nossos isolados, como a infectividade e a virulência, até porque todos os subtipos identificados neste estudo foram isolados de humanos e animais com diarreia, o que demonstra o seu potencial patogénico. O significado epidemiológico da existência, na mesma região, de dois tipos de sequência geneticamente distintos dentro do subtipo IIdA22G1 fica por determinar, revelando-se necessário a realização de mais estudos com um maior número de amostras. Fica também por determinar o potencial epidemiológico da existência, nesta mesma região, de sequências dentro dos subtipos IIdA25G1 e IIdA27G1 com diferentes polimorfismos.

Portanto, a análise epidemiológica dos nossos resultados e dos resultados descritos previamente noutros estudos realizados no gado bovino da Roménia, sugere desta forma que neste país, especificamente no distrito de Timis, há uma segregação geográfica de alguns subtipos de *C. parvum*, tendo em conta a elevada prevalência da

família de subtipo IId caracterizada neste estudo, em oposição à elevada prevalência da família IIa caracterizada em estudos prévios, nesta mesma região (Imre *et al.* 2010, 2011). A presença de aglomerados de subtipos espacialmente distribuídos dentro de um país, neste caso dentro do distrito de Timis, Roménia, poderá dever-se a uma possível transmissão comum e localizada, devido à partilha de equipamentos do foro veterinário ou através de peças de vestuário dos tratadores, ao contacto com o gado vizinho ou eventualmente até com animais selvagens (Brook *et al.* 2009). Também o claro predomínio de infecção pelo subtipo IIdA27G1 no gado bovino verificado neste estudo, à semelhança do que foi constatado noutros estudos relativamente a outros subtipos, poderá dever-se à frequente troca de animais entre explorações pecuárias numa limitada extensão geográfica, ou ao *fitness* genético deste subtipo (Alves *et al.* 2003, 2006; Xiao *et al.* 2007). Por último, importa referir que a presença de múltiplos subtipos neste estudo, pode eventualmente reflectir possíveis políticas de gestão das explorações pecuárias, como a compra e a troca de vitelos, bem como a mistura de animais de diferentes espécies e idades, prática comum nos EUA, o que promove a introdução de novos subtipos naquela população (Xiao *et al.* 2007; Soba & Logar, 2008; Brook *et al.* 2009). Contudo, uma vez que desconhecemos o número de subtipos presentes por cada exploração pecuária, assim como as suas políticas de gestão, temos também de considerar a hipótese destas não permitirem a entrada de novos animais e, como tal, existir apenas um único subtipo responsável pelas infecções em cada exploração pecuária (Soba & Logar, 2008).

Em suma, este estudo dá um importante contributo para a clarificação da epidemiologia dos subtipos de *C. parvum* que infectam os humanos e os animais do distrito de Timis, Roménia. Nesta região, os resultados de subgenotipagem sugerem que os casos de criptosporidiose humana parecem ocorrer principalmente através da transmissão zoonótica. O gado doméstico parece constituir um grande reservatório zoonótico, e que perante condições propícias, como a existência de hospedeiros susceptíveis e o subsequente contacto com oocistos viáveis, facilita a transmissão, directa ou indirectamente aos humanos. Para além disso, neste estudo a família de subtipo IId, mais do que a família IIa, adquire uma dimensão epidemiológica distinta da descrita até então na literatura, ao ser responsável pela maioria dos casos de criptosporidiose humana e animal, principalmente nos bovinos. Importa salientar que os

nossos resultados, e aqueles publicados até ao momento necessitam, no entanto, de ser corroborados por mais estudos a realizar no distrito de Timis, Roménia, mas também noutras regiões deste país, assim como em diferentes populações, com o propósito de podermos construir uma carta epidemiológica que reflecta os reservatórios e a dinâmica de transmissão presente na Roménia. Também o conhecimento mais aprofundado das características epidemiológicas das espécies e subtipos de *Cryptosporidium* presentes nas populações humana e animal deste país, reveste-se de fundamental importância para o posterior planeamento e elaboração de estratégias e medidas de prevenção, controlo e vigilância, que visam reduzir a transmissão de *Cryptosporidium* spp. nos humanos e nos animais da Roménia.

Quadro XV. Subtipos de *C. parvum* descritos no gado doméstico dos países europeus

País	Hospedeiro (n)	Subtipo <i>major</i> (n)	Outros subtipos (n)	Referência
Roménia	Bovinos (17)	IIdA27G1 (8)	IIdA21G1a (1), IIdA22G1 (2), IIdA25G1 (5), IIdA16G1R1 (1)	Presente estudo
	Suíños (1)	IIdA26G1 (1)	-	
	Bovinos (13)	IIdA15G2R1 (8)	IIdA16G1R1 (5)	Imre <i>et al.</i> 2011
	Ovinos (1)	IIdA22G2R1 (1)	-	Imre <i>et al.</i> 2010
Hungria	Bovinos (21)	IIdA16G1R1 (15)	IIdA18G1R1 (1), IIdA17G1R1 (3), IIdA19G1 (1), IIdA22G1 (1)	Plutzer & Karanis, 2007
Sérvia e Montenegro	Bovinos (18)	IIdA16G1R1b (6)	IIdA18G1R1 (2), IIdA20G1R1 (2), IIdA18G1b (2), IIdA16R2 (4), IIdA17R2 (2)	Misic & Abe, 2007
Eslovénia	Bovinos (45)	IIdA15G2R1 (27)	IIdA13R1 (5), IIdA16R1 (3), IIdA16G1R1 (6) , IIdA16R2 (2), IIdA18R2 (2)	Soba & Logar, 2008
República Checa	Bovinos (1)	IIdA16G1R1 (1)	-	Ondráčková <i>et al.</i> 2009
	Suíños (2)	IIdA16G1R1b (2)	-	Kvác <i>et al.</i> 2009
Alemanha	Bovinos (53)	IIdA15G2R1 (43)	IIdA14G2R1 (2), IIdA16G1R1 (1) , IIdA17G2R1 (2), IIdA18G2R1 (2), IIdA21G0R1 (1), IIdA22G1R1 (1), IIdA22G1 (1)	Broglia <i>et al.</i> 2008
Bélgica	Bovinos (90)	IIdA15G2R1 (84)	IIdA13G2R1 (1), IIdA14G2R1 (1), IIdA16G2R1 (3), IIdA22G1 (1)	Geurden <i>et al.</i> 2007
Suécia	Bovinos (13)	IIdA15G1R1 (2) IIdA18G1R1 (2) IIdA21G1R1 (2) IIdA20G1e (2) IIdA23G1 (2)	IIdA16G1 (1), IIdA16G1R1 (1), IIdA22G1c (1)	Silverlås <i>et al.</i> 2010
Reino Unido	Bovinos (51)	IIdA15G2R1 (35)	IIdA14G2R1 (1), IIdA16G3R1 (4), IIdA17G1R1 (7), IIdA18G1R1 (2), IIdA19G1R1 (2)	Brook <i>et al.</i> 2009
Espanha	Ovinos (131)	IIdA17G1a (44)	IIdA15G2R1 (2), IIdA18G3R1 (1), IIdA14G1 (2), IIdA15G1 (3), IIdA17G1b (26), IIdA18G1 (15), IIdA19G1 (33), IIdA21G1 (1), IIdA22G1 (2), IIdA24G1 (2)	Quílez <i>et al.</i> 2008
	Caprinos (17)	IIdA17G1a (8)	IIdA19G1 (4), IIdA25G1 (2), IIdA26G1 (3)	
Portugal	Bovinos (72)	IIdA15G2R1 (61)	IIdA16G2R1 (7), IIdA17G1 (4)	Alves <i>et al.</i> 2006
	Ruminantes do zoo (9)	IIdA15G2R1 (9)	-	
	Ovinos (2)	IIdA15G2R1 (1), IIdA21G1 (1)	-	

Nota: a negrito encontram-se os subtipos caracterizados neste estudo e que são comuns a outros estudos.

4.5. Constituição genética da população de *Cryptosporidium* spp. nos humanos e animais: Portugal vs Roménia

Em Portugal, tanto quanto sabemos, ainda não foram realizados estudos de genotipagem de espécies de *Cryptosporidium* especificamente direccionados para a população pediátrica, tendo sido realizados maioritariamente em doentes adultos seropositivos para VIH. A comparação da constituição genética das espécies de *Cryptosporidium* presentes em ambos os países, Roménia e Portugal, será realizada tendo em consideração o facto de os indivíduos de cada país apresentarem características demográficas, clínicas e imunológicas muito distintas. Na Roménia, como já foi referido, a espécie *C. parvum* foi a única espécie descrita nas crianças submetidas a este estudo. À semelhança do que foi descrito em diversos países do continente europeu, vários estudos consecutivos realizados em Portugal estão de acordo com o predomínio da infecção por *C. parvum*, tendo sido descritas prevalências de infecção de 54,5% (12/22) em 2001, 55,2% (16/29) em 2003, e 55% (22/40) em 2004, enquanto a percentagem de infecção atribuída a *C. hominis* foi significativamente mais reduzida, nomeadamente 31,8% (7/22) em 2001, 24,1% (7/29) em 2003, e 27,5% (11/40) em 2004 (Alves *et al.* 2001, 2003; Matos *et al.* 2004). Estes resultados, como já foi referido, são consistentes com o padrão epidemiológico de ambas as espécies, uma vez que enquanto a infecção por *C. parvum* é mais frequente na Europa, nomeadamente no Reino Unido, na Irlanda do Norte, na França e na Suíça (McLauchlin *et al.* 2000; Morgan *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2001; Lowery *et al.* 2001; Leoni *et al.* 2006), a infecção por *C. hominis* é mais comum noutros países industrializados, como nos EUA e na Austrália (Pieniazek *et al.* 1999; O'Brien *et al.* 2008; Jex *et al.* 2008b), mas também nos países em desenvolvimento, como a Jamaica, o Perú, a África do Sul, o Quénia e o Malawi (Xiao *et al.* 2001a; Leav *et al.* 2002; Gatei *et al.* 2003; Cama *et al.* 2007; Gatei *et al.* 2008). Para além de *C. parvum* e de *C. hominis*, os estudos realizados em Portugal identificaram adicionalmente, embora num reduzido número de infecções, as espécies *C. felis* e *C. meleagridis* (Alves *et al.* 2001, 2003; Matos *et al.* 2004), o que é consistente com os estudos realizados na Europa, os quais revelam que a infecção por estas espécies é mais frequente em indivíduos imunocomprometidos (Morgan *et al.* 2000; Guyot *et al.* 2001). Os estudos realizados em Portugal, comparativamente à Roménia, demonstram a existência de uma maior diversidade de espécies de

Cryptosporidium responsáveis pela criptosporidiose humana, a que não será indiferente o facto de os doentes seropositivos para VIH constituírem a população alvo de estudo em Portugal.

Relativamente aos animais, os estudos de criptosporidiose realizados em Portugal, têm incidido principalmente no gado bovino, tendo ainda sido realizados alguns estudos em ruminantes do zoo. No nosso estudo, e à semelhança de estudos prévios realizados na Roménia (Imre *et al.* 2010, 2011), os animais encontravam-se infectados por uma única espécie, *C. parvum*. Em Portugal, os dados publicados relativos a vários estudos até ao momento, são consistentes com os dados da Roménia e de outros países, tendo em conta que *C. parvum* é igualmente predominante nos ruminantes do nosso país. Esta foi a única espécie identificada em bovinos de explorações pecuárias do Alentejo e Ribatejo (Pereira da Fonseca *et al.* 2001), em vitelos provenientes de quatro áreas geográficas distintas (região centro, centro/sul, sul e arquipélago dos Açores) e em ruminantes do Zoo de Lisboa (Alves *et al.* 2003), e mais recentemente, em vitelos de explorações pecuárias localizadas nas regiões da Beira Litoral e Entre Douro e Minho (Mendonça *et al.* 2007). Contudo, estes autores caracterizaram adicionalmente, num isolado cada, as espécies *C. andersoni* e *C. meleagridis* (Mendonça *et al.* 2007). A identificação destas duas últimas espécies foi realizada em bovinos jovens e adultos e os autores não associaram a idade dos bovinos com a presença destas espécies (Mendonça *et al.* 2007) e, sendo a caracterização de *C. meleagridis* nestes animais invulgar, estes resultados devem ser interpretados com cuidado. A elevada prevalência de *C. parvum* nos animais em Portugal, principalmente no que respeita aos vitelos, como já foi referido por comparação com os resultados obtidos neste estudo, são consistentes com inúmeros estudos realizados em diversas áreas geográficas, como os EUA, o Canadá, o Reino Unido, a Alemanha, a Bélgica, a Eslovénia, a Sérvia e Montenegro, e a Hungria, nos quais *C. parvum* tem sido a espécie predominantemente descrita nos vitelos (McLauchlin *et al.* 2000; Santín *et al.* 2004, 2008; Trotz-Williams *et al.* 2006; Geurden *et al.* 2007; Misic & Abe, 2007; Plutzer & Karanis, 2007; Broglia *et al.* 2008; Soba & Logar, 2008; Brook *et al.* 2009).

No que respeita à subgenotipagem através da caracterização do gene GP60, os dados publicados em Portugal relativamente aos isolados de origem humana e animal são muito distintos, verificando-se que enquanto os primeiros manifestam uma grande

diversidade genética, tendo sido descritas cinco famílias de subtipo de *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie, If) e quatro famílias de subtipo de *C. parvum* (IIa, IIb, IIc, IId), a diversidade genética dos isolados de origem animal parece ser mais limitada, uma vez que estes distribuem-se apenas por duas famílias de subtipo de *C. parvum*, IIa e IId (Alves *et al.* 2003, 2006). Relativamente à espécie *C. hominis*, a família de subtipo Ib foi a mais comum, tendo sido caracterizado o subtipo IbA10G2 (66,7%; 10/15), seguida da família Ie, subtipo IeA11G3T3 (13,3%; 2/15), tendo sido as restantes famílias, Ia, Id e If, e respectivos subtipos IaA19R3, IdA15 e IfA14G1, descritas num isolado cada (Alves *et al.* 2003, 2006). A prevalência destes subtipos em Portugal é corroborada por outros estudos, tendo em conta que o predomínio da infecção pelo subtipo IbA10G2 da família Ib de *C. hominis* já foi descrito noutros países industrializados, como a Holanda, a Austrália e o Reino Unido (Wielinga *et al.* 2008; Chalmers *et al.* 2008; O'Brien *et al.* 2008; Jex *et al.* 2008b), sendo também frequente em países em desenvolvimento como o Peru e a Jamaica (Cama *et al.* 2007; Gatei *et al.* 2008). Por outro lado, as restantes famílias de subtipo, identificadas num reduzido número de isolados em Portugal, são mais frequentemente descritas nos países em desenvolvimento, nomeadamente no Peru, na África do Sul, na Nigéria, no Malawi e na Índia (Leav *et al.* 2002; Peng *et al.* 2003; Ajajampur *et al.* 2007; Cama *et al.* 2007; Molloy *et al.* 2010).

Relativamente à espécie *C. parvum*, a família de subtipo mais comum nos isolados de origem humana portugueses foi a IIa (36%; 9/25), seguida das famílias IId (32%; 8/25) e IIc (28%; 7/25), enquanto a família de subtipo IIb foi descrita num único isolado (4%; 1/25) (Alves *et al.* 2003, 2006). As infecções humanas com a família de subtipo IIa de *C. parvum* são frequentemente descritas em Portugal, na Holanda, na Eslovénia, na Austrália e em zonas rurais da América do Norte, nas regiões onde há uma intensa exploração pecuária (Alves *et al.* 2003, 2006; Feltus *et al.* 2006; O'Brien *et al.* 2008; Soba & Logar, 2008; Wielinga *et al.* 2008), verificando-se que nos humanos, o subtipo predominante desta família, é também o mais comum no gado daquelas regiões (Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010). Os dados publicados em Portugal são consistentes com estas observações, uma vez que o subtipo IIaA15G2R1 da família IIa de *C. parvum* foi o único subtipo desta família caracterizado nos humanos, e o subtipo predominante nos bovinos (84,7%; 61/72), seguido do subtipo IIaA16G2R1 (9,7%; 7/72). Também nos ruminantes do zoo, o subtipo IIaA15G2R1 foi o único subtipo

caracterizado (100%; 9/9), tendo sido também descrito num isolado de origem ovina e num veado (Alves *et al.* 2006). Por sua vez, na Roménia, a família de subtipo IIa ainda só foi caracterizada em bovinos, verificando-se que o subtipo IIaA15G2R1, à semelhança de Portugal, foi o predominante em dois estudos consecutivos, seguido do subtipo IIaA16G1R1 (Imre *et al.* 2010, 2011). No entanto, o subtipo IIaA16G1R1, o único subtipo da família IIa caracterizado no nosso estudo, ainda não foi previamente caracterizado em Portugal.

No que respeita à família de subtipo IId de *C. parvum*, em Portugal esta família foi a segunda mais prevalente quer nos isolados de origem humana quer nos isolados de origem animal. Relativamente aos primeiros foram caracterizados quatro subtipos, nomeadamente IIdA17G1, IIdA19G1, IIdA21G1 e IIdA22G1, de entre os quais o IIdA19G1 foi o mais prevalente (Alves *et al.* 2006). Para além disso, o potencial zoonótico de dois subtipos ficou evidente ao terem sido também descritos em animais, nomeadamente o subtipo IIdA17G1, caracterizado em quatro isolados de origem bovina, e o subtipo IIdA21G1, caracterizado num isolado de origem ovina (Alves *et al.* 2006). Na Roménia, esta família tem sido descrita ocasionalmente, contudo, no nosso estudo, para além de ter sido a mais comum, contrariamente a Portugal, apresentou alguma diversidade de subtipos, principalmente na população bovina. Alguns dos subtipos caracterizados em Portugal são comuns ao nosso estudo, realizado no distrito de Timis, Roménia, nomeadamente o subtipo IIdA21G1, caracterizado num único isolado de origem bovina, e o subtipo IIdA22G1, caracterizado em todos os isolados origem humana e em dois isolados de origem bovina. Os outros subtipos caracterizados no nosso estudo, IIdA25G1, IIdA26G1 e IIdA27G1, ainda não foram caracterizados em Portugal.

Em Portugal foram ainda caracterizadas as famílias de subtipo IIc e IIb de *C. parvum* na população humana. Na primeira família foram caracterizados os subtipos IIcA5G3a e IIcA5G3b, tendo sido este último o segundo subtipo de *C. parvum* mais prevalente nesta população (24%; 6/25), enquanto na família IIb foi caracterizado o subtipo IIbA14 num único isolado (Alves *et al.* 2003; 2006). Na Roménia, as famílias de subtipo IIc e IIb não foram caracterizadas na população humana nem na população animal estudada.

A comparação dos dados publicados em Portugal com os da Roménia, inclusive os do nosso estudo, suporta a existência de padrões epidemiológicos distintos em ambos os países, particularmente no que refere à população humana. A caracterização de ambas as espécies, *C. parvum* e *C. hominis* em Portugal, reflecte não somente a existência de diferentes tipos de reservatórios e diferentes fontes de infecção, mas também a existência de modos de transmissão distintos, os quais parecem ser responsáveis pela distribuição e prevalência de ambas as espécies na população humana portuguesa (Alves *et al.* 2003, 2006), contrariamente à Roménia, uma vez que a exclusiva identificação de *C. parvum* sugere que a transmissão zoonótica pode ser o modo de transmissão predominante nos humanos deste país. Por outro lado, a caracterização dos subtipos de ambas as espécies na população humana em Portugal, corroboram estas observações e demonstram, para além da existência de uma grande diversidade genética, a presença de uma dinâmica de transmissão muito complexa, ao terem sido caracterizadas famílias de subtipo de *C. parvum* nesta população que se suspeita ter origem antroponótica, IIc e IIb, uma vez que até à data, só ainda foram descritos em humanos dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Xiao & Feng, 2008; Xiao, 2010), não tendo sido ainda identificados em ruminantes dos países desenvolvidos (Alves *et al.* 2006; O'Brien *et al.* 2008; Soba & Logar, 2008; Wielinga *et al.* 2008; Xiao, 2010). Como tal, nem todos os subtipos de *C. parvum* caracterizados na população humana portuguesa resultaram de infecções zoonóticas (Alves *et al.* 2006). Contrariamente a estes resultados, a dinâmica de transmissão nos humanos da Roménia parece não ser tão intrincada, uma vez que apenas foi caracterizado o subtipo IIIdA22G1, um subtipo que se sabe ser zoonótico, ao ter sido previamente caracterizado em bovinos e pequenos ruminantes (Geurden *et al.* 2007; Plutzer & Karanis, 2007; Broglia *et al.* 2008; Quílez *et al.* 2008; Silverlås *et al.* 2010). Apesar da clara importância da transmissão antroponótica em Portugal, importa salientar que um importante número de infecções na população humana portuguesa foi atribuído a subtipos zoonóticos e, como tal, à semelhança do que foi descrito na Roménia, a transmissão zoonótica parece ter também um papel muito preponderante na criptosporidiose humana, contribuindo para o efeito, a existência de um grande número de reservatórios zoonóticos no nosso país.

No que respeita aos animais, os estudos realizados em ambos os países, inclusive o nosso estudo, sugerem a existência de um padrão epidemiológico semelhante, tendo em conta que *C. parvum* foi a única espécie descrita nos diversos animais. Por outro lado, ambas as famílias de subtipo IIa e IId de *C. parvum* já foram previamente caracterizadas em ambos os países, incluindo o predomínio do subtipo IIaA15G2R1 (Alves *et al.* 2003, 2006, Imre *et al.* 2010, 2011). Curiosamente, os resultados do nosso estudo são um pouco contraditórios tendo em conta a elevada prevalência da família de subtipo IId encontrada, mas também a existência de alguma diversidade genética observada nesta família, em oposição à limitada diversidade genética dos estudos anteriores quer da Roménia quer de Portugal. Contudo, à semelhança do nosso estudo, a segregação geográfica da família de subtipo IId também já foi descrita em Portugal ao verificar-se que enquanto os subtipos IIaA15G2R1 e IIaA16G2R1 estavam dispersos por vitelos de vários municípios deste país, o subtipo IIdA17G1 estava concentrado em vitelos do município de Odemira, onde não foram descritos outros subtipos (Alves *et al.* 2006). Portanto, e apesar de alguns dos subtipos identificados em ambos os países serem diferentes entre si, as implicações epidemiológicas em ambos os países parecem ser semelhantes. Em Portugal, os estudos de genotipagem realizados suportam a noção de que os animais, nomeadamente os vitelos e os ruminantes do zoo, constituem um risco para a saúde pública enquanto principais reservatórios de uma espécie potencialmente zoonótica, ao serem caracterizadas famílias de subtipo que se sabe serem zoonóticas, sugerindo desta forma, que estes animais são uma potencial fonte de infecção para a ocorrência de surtos esporádicos nos humanos. Também no distrito de Timis, Roménia, a caracterização dos diversos subtipos zoonóticos de *C. parvum* nos animais desta região sugere que estes possam constituir um risco para a saúde pública enquanto reservatórios de uma espécie potencialmente zoonótica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJJAMPUR, S.S. GLADSTONE, B.P. SELVAPANDIAN, D. MULIYIL, J.P. WARD, H. & KANG, G. (2007) Molecular and spatial epidemiology of cryptosporidiosis in children in a semiurban community in South India. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (3), pp. 915-920.
- ALVES, M. MATOS, O. & ANTUNES, F. (2001) Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95 (6), pp. 627-632.
- ALVES, M. XIAO, L. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2006) Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, 99 (3), pp. 287-292.
- ALVES, M. XIAO, L. SULAIMAN, I. LAL, A. MATOS, O. & ANTUNES, F. (2003) Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (6), pp. 2744-2747.
- BEJAN, A. MIRCEAN, V. RADU, C. SMARO, S. & COZMA, V. (2009) Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. infection in goat kids in the central and the northwest part of Romania. *Scientia Parasitologica*, 1, pp. 32-36.
- BOOM, R. SOL, C.J. SALIMANS, M.M. JANSEN, C.L. WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M. & VANS DER NOORDAA, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3), pp. 495-503.
- BORAD, A. & WARD, H. (2010) Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiology*, 5 (3), pp. 507-519.
- BOROWSKI, H. THOMPSON, R. ARMSTRONG, T. & CLODE, P. (2010) Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an *in vitro* model system. *Parasitology*, 137 (1), pp. 13-26.
- BRANDONISIO, O. MARANGI, A. PANARO, M.A. MARZIO, R. NATALICCHIO, M.I. ZIZZADORO, P. & DE SANTIS, U. (1996) Prevalence of *Cryptosporidium* in children with enteritis in southern Italy. *European Journal of Epidemiology*, 12 (2), pp. 187-190.

- BROGLIA, A. RECKINGER, A. CACCIÒ, S.M. & NOCKLER, K. (2008) Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology*, 154 (1-2), pp. 8-13.
- BROOK, E.J. ANTHONY, H.C. FRENCH, N.P. & CHRISTLEY, R.M. (2009) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Veterinary Journal*, 179 (3), pp. 378-382.
- CACCIÒ, S. THOMPSON, R. MCLAUCHLIN, J. & SMITH, H. (2005) Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21 (9), pp. 430-437.
- CAI, J. COLLINS, M.D. MCDONALD, V. & THOMPSON, D.E. (1992) PCR cloning and nucleotide sequence determination of the 18S rRNA genes and internal transcribed spacer 1 of the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1131 (3), pp. 317-320.
- CAMA, V. ROSS, J. CRAWFORD, S. KAWAI, V. CHAVEZ-VALDEZ, R. VARGAS, D. VIVAR, A. TICONA, E. NAVINCOPA, M. WILLIAMSON, J. ORTEGA, Y. GILMAN, R.H. BERN, C. & XIAO, L. (2007) Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *The Journal of Infectious Diseases*, 196 (5), pp. 684-691.
- CAREY, C. LEE, H. & TREVORS, J. (2004) Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 38 (4), pp. 818-862.
- CARRENO, R. MARTIN, D. & BARTA, J. (1999) *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85 (11), pp. 899-904.
- CASEMORE, D. (1990) Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiology & Infection*, 104 (1), pp. 1-28.
- CASEMORE, D. ARMSTRONG, M. & SANDS, R. (1985) Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 38 (12), pp. 1337-1341.

- CASTRO-HERMIDA, J.A. GONZÁLEZ-LOSADA, Y.A. & ARES-MAZÁS, E. (2002) Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 106 (1), pp. 1-10.
- CEVALLOS, A. ZHANG, X. WALDOR, M. JAISON, S. ZHOU, X. TZIPORI, S. NEUTRA, M. & WARD, H. (2000) Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium*. *Infection and Immunity*, 68 (7), pp. 4108-4116.
- CHALMERS, R.M. & DAVIES, A.P. (2010) Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental parasitology*, 124 (1), pp. 138-146.
- CHALMERS, R.M. HADFIELD, S.J. JACKSON, C.J. ELWIN, K. XIAO, L. & HUNTER, P. (2008) Geographic linkage and variation in *Cryptosporidium hominis*. *Emerging Infectious Disease*, 14 (3), pp. 496-498.
- CHALMERS, R.M. SMITH, R.P. HADFIELD, S.J. ELWIN, K. & GILES, M. (2011) Zoonotic linkage and variation in *Cryptosporidium parvum* from patients in the United Kingdom. *Parasitology Research*, 108, pp. 1321-1325.
- CHEN, X.M. KEITHLY, J.S. PAYA, C.V. & LARUSSO, N.F. (2002) Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine*, 346 (22), pp. 1723-1732.
- CLARK, D.P. (1999) New insights into human cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), pp. 554-563.
- CLAVEL, A. OLIVARES, J.L. FLETA, J. CASTILLO, J. VAREA, M. RAMOS, F.J. ARNAL, A.C. & QUÍLEZ, J. (1996) Seasonality of cryptosporidiosis in children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 15 (1), pp. 77-79.
- CURRENT, W. & GARCIA, L. (1991) Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (3), pp. 325-358.
- DE GRAAF, D.C. VANOPDENBOSCH, E. ORTEGA-MORA, L.M. ABBASSI, H. & PEETERS, J.E. (1999) A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 29 (8), pp. 1269-1287.
- DE LA FUENTE, R. LUZÓN, M. RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A. GARCÍA, A. CID, D. ORDEN, J.A. GARCÍA, S. SANZ, R. & GÓMEZ-BAUTISTA, M. (1999) *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-

- day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, 80 (3), pp. 179-185.
- DILLINGHAM, R. LIMA, A. & GUERRANT, R. (2002) Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4 (10), pp. 1059-1066.
- DUPONT, H.L. CHAPPELL, C.L. STERLING, C.R. OKHUYSEN, P.C. ROSE, J.B. & JAKUBOWSKI, W. (1995) The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*, 332 (13), pp. 855-859.
- EGYED, Z. SRÉTER, T. SZÉLL, Z. & VARGA, I. (2003) Characterization of *Cryptosporidium* spp.-recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, 111 (2-3), pp. 103-114.
- FAYER, R. & UNGAR, B. (1986) *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50 (4), pp. 458-483.
- FAYER, R. (2004) *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126 (1-2), pp. 37-56.
- FAYER, R. (2008) The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. & XIAO, L. (eds.). *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 1-42.
- FAYER, R. (2010) Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124 (1), pp. 90-97.
- FAYER, R. MORGAN, U. & UPTON, S.J. (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30 (12-13), pp. 1305-1322.
- FAYER, R. SANTÍN, M. & TROUT, J.M. (2007) Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4), pp. 260-266.
- FAYER, R. SANTÍN, M. TROUT, J.M. & GREINER, E. (2006) Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 135 (2), pp. 105-112.

- FAYER, R. TROUT, J.M. XIAO, L. MORGAN, U.M. LAL, A.A. & DUBEY, J.P. (2001) *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, 87 (6), pp. 1415-1422.
- FELTUS, D.C. GIDDINGS, C.W. SCHNECK, B.L. MONSON, T. WARSHAUER, D. & MCEVOY, J.M. (2006) Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (12), pp. 4303-4308.
- FENG, Y. ORTEGA, Y. HE, G. DAS, P. XU, M. ZHANG, X. FAYER, R. GATEI, W. CAMA, V. & XIAO, L. (2007) Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, 144 (1-2), pp. 1-9.
- FERGUSON, C. DEERE, D. SINCLAIR, M. CHALMERS, R.M. ELWIN, K. HADFIELD, S. XIAO, L. RYAN, U. GASSER, R. EL-OSTA, Y.A. & STEVENS, M. (2006) Meeting report: application of genotyping methods to assess risks from *Cryptosporidium* in watersheds. *Environmental Health Perspectives*, 114 (3), pp. 430-434.
- GATEI, W. BARRET, D. LINDO, J. ELDEMIRE-SHEARER, D. CAMA, V. & XIAO, L. (2008) Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. *Emerging Infectious Disease*, 14 (5), pp. 841-843.
- GATEI, W. GREENSILL, J. ASHFORD, R.W. CUEVAS, L.E. PARRY, C.M. CUNLIFFE, N.A. BEECHING, N.J. & HART, C.A. (2003) Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (4), pp. 1458-1462.
- GEURDEN, T. BERKVEN, D. MARTENS, C. CASAERT, S. VERCRUYSE, J. & CLAEREBOU, E. (2007) Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*, 134, pp. 1981-1987.
- GOOKIN, J. NORDONE, S. & ARGENZIO, R. (2002) Host responses to *Cryptosporidium* infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (1), pp. 12-21.
- GUERRANT, R.L. (1997) Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerging Infectious Disease*, 3 (1), pp. 51-57.

- GUYOT, K. FOLLET-DUMOULIN, A. LELIEVRE, E. SARFATI, C. RABODONIRINA, M. NEVEZ, G. CAILLIEZ, J.C. CAMUS, D. & DEI-CAS, E. (2001) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (10), pp. 3472-3480.
- HAJDUŠEK, O. DITRICH, O. & SLAPETA, J. (2004) Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 122 (3), pp. 183-192.
- HIJJAWI, N.S. MELONI, B.P. NG'ANZO, M. RYAN, U.M. OLSON, M.E. COX, P.T. MONIS, P.T. & THOMPSON, R.C. (2004) Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology*, 34 (7), pp. 769-777.
- HIJJAWI, N.S. MELONI, B.P. RYAN, U.M. OLSON, M.E. & THOMPSON, R.C. (2002) Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 32 (14), pp. 1719-1726.
- HUANG, D.B. CHAPPELL, C. & OKHUYSEN, P.C. (2004) Cryptosporidiosis in children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15 (4), pp. 253-259.
- HUETINK, R.E. VAN DER GIESSEN, J.W. NOORDHUIZEN, J.P. & PLOEGER, H.W. (2001) Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology*, 102 (1-2), pp. 53-67.
- HUNTER, P. & NICHOLS, G. (2002) Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (1), pp. 145-154.
- HUNTER, P.R. & THOMPSON, R.C. (2005) The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 35 (11-12), pp. 1181-1190.
- HUNTER, P.R. CHALMERS, R.M. SYED, Q. HUGHES, L.S. WOODHOUSE, S. & SWIFT, L. (2003) Foot and mouth disease and cryptosporidiosis: possible interaction between two emerging infectious diseases. *Emerging Infectious Disease*, 9 (1), pp. 109-112.

- HUNTER, P.R. HUGHES, S. WOODHOUSE, S. SYED, Q. VERLANDER, N.Q. CHALMERS, R.M. MORGAN, K. NICHOLS, G. BEECHING, N. & OSBORN, K. (2004) Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerging Infectious Disease*, 10 (7), pp. 1241-1249.
- IMRE, K. DĂRĂBUȘ, G. MEDERLE, N. OPRESCU, I. MORARIU, S. ILIE, M. HOTEA, I. IMRE, M. INDRE, D. BALINT, A. & SORESCU, D. (2010) Intraspecific characterization of some *Cryptosporidium parvum* isolates from calves and lambs in Western Romania using molecular techniques. *Scientia Parasitologica*, 11 (1), pp. 47-50.
- IMRE, K. LOBO, L.M. MATOS, O. POPESCU, C. GENCHI, C. & DĂRĂBUȘ, G. (2011) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in Romania: Is there an actual risk of zoonotic infections? *Veterinary Parasitology*, 181 (2-4), pp. 321-324.
- IQBAL, J. MUNIR, M.A. & KHAN, M.A. (1999) *Cryptosporidium* infection in young children with diarrhea in Rawalpindi, Pakistan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60 (5), pp. 868-870.
- ISEKI, M. (1979) *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*, 28 (5), pp. 285-307.
- IZUMIYAMA, S. FURUKAWA, I. KUROKI, T. YAMAI, S. SUGIYAMA, H. YAGITA, K. & ENDO, T. (2001) Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 54 (1), pp. 23-26.
- JEX, A.R. PANGASA, A. CAMPBELL, B.E. WHIPP, M. HOGG, G. SINCLAIR, M.I. STEVENS, M. & GASSER, R.B. (2008b) Classification of *Cryptosporidium* from sporadic cryptosporidiosis cases in humans employing sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (7), pp. 2252-2262.
- JEX, A.R. SMITH, H.V. MONIS, P.T. CAMPBELL, B.E. & GASSER, R.B. (2008a) *Cryptosporidium*-Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26 (4), pp. 304-317.

- JOHNSON, J. BUDDLE, R. REID, S. ARMSON, A. & RYAN, U.M. (2008) Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Experimental Parasitology*, 119 (3), pp. 418-421.
- KHAN, W.A. ROGERS, K.A. KARIM, M.M. AHMED, S. HIBERD, P.L. CALDERWOOD, S.B. RYAN, E.T. & WARD, H.D. (2004) Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody response. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71 (4), pp. 412-419.
- KOSEK, M. ALCANTARA, C. LIMA, A.A. & GUERRANT, R.C. (2001) Cryptosporidiosis: an update. *The Lancet infectious diseases*, 1 (4), pp. 262-269.
- KVÁČ, M. BOHUMIL, S. HANZLÍKOVÁ, D. KOTILOVÁ, J. & KVĚTOŇOVÁ, D. (2009) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitology Research*, 104 (2), pp. 425-428.
- LACROIX, C. BERTHIER, M. AGIUS, C. BONNEAU, D. PALLU, B. & JACQUEMIN, J.L. (1987) *Cryptosporidium* oocysts in immunocompetent children: epidemiologic investigations in the day-care centers of Poitiers, France. *European Journal of Epidemiology*, 3 (4), pp. 381-385.
- LE BLANCQ, S.M. KHRAMTSOV, N.V. ZAMANI, F. UPTON, S.J. & WU, T.W. (1997) Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90 (2), pp. 463-478.
- LEARMONTH, J.J. IONAS, G. EBBETT, K.A. & KWAN, E.S. (2004) Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (7), pp. 3973-3978.
- LEAV, B.A. MACKAY, M. & WARD, H.D. (2003) *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clinical Infectious Diseases*, 36 (7), pp. 903-908.
- LEAV, B.A. MACKAY, M.R. ANYANWU, A. O'CONNOR, R.M. CEVALLOS, A.M. KINDRA, G. ROLLINS, N.C. BENNISH, M.L. NELSON, R.G. & WARD, H.D. (2002) Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic *Cpgp40/15* locus

among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infection and Immunity*, 70 (7), pp. 3881-3890.

LEONI, F. AMAR, C. NICHOLS, G. PEDRAZA-DÍAZ, S. & MCLAUCHLIN, J. (2006) Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*, 55 (Pt. 6), pp. 703-707.

LINDSAY, D.S. UPTON, S.J. OWENS, D.S. MORGAN, U.M. MEAD, J.R. & BLAGBURN, B.L. (2000) *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47 (1), pp. 91-95.

LOBO, M.L. XIAO, L. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2009) Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Letters in Applied Microbiology*, 48 (6), pp. 732-737.

LOWERY, C.J. MILLAR, B.C. MOORE, J.E. XU, J. XIAO, L. ROONEY, P.J. CROTHERS, L. & DOOLEY, J.S. (2001) Molecular genotyping of human cryptosporidiosis in Northern Ireland: epidemiological aspects and review. *Irish Journal of Medicine Sciences*, 170 (4), 246-250.

MAC KENZIE, W.R. HOXIE N.J. PROCTOR, M.E. GRADUS, M.S. BLAIR, K.A. PETERSON, D.E. KAZMIERCZK, J.J. ADDISS, D.G. FOX, K.R. ROSE, J.B. & JEFFREY, P.D. (1994) A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, 331 (3), pp. 161-167.

MATOS, O. ALVES, M. XIAO, L. CAMA, V. & ANTUNES, F. (2004) *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. *Emerging Infectious Disease*, 10 (12), pp. 2256-2257.

MATOS, O. TOMÁS, A. AGUIAR, P. CASEMORE, D. & ANTUNES, F. (1998) Prevalence of cryptosporidiosis in AIDS patients with diarrhoea in Santa Maria Hospital, Lisbon. *Folia Parasitologica*, 45, pp. 163-166.

MCLAUCHLIN, J. PEDRAZA-DÍAZ, P. & NICHOLS, G.L. (2000) Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of

genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (11), pp. 3984-3990.

MCLAUCHLIN, J. PEDRAZA-DÍAZ, S. AMAR-HOETZENEDER, C. & NICHOLS, G.L. (1999) Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (10), pp. 3153-3158.

MEDERLE, O. MEDERLE, N. DĂRĂBUȘ, G.H. IMRE, K. & OLARIU, T.R. (2009) Epidemiological investigations in human cryptosporidiosis. Preliminary study. *Lucrări științifice medicină veterinară*, 12 (1), pp. 54-58.

MENDONÇA, C. ALMEIDA, A. CASTRO, A. DE LURDES, D.M. SOARES, S. DA COSTA, J.M. & CANADA, N. (2007) Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology*, 147 (1-2), pp. 47-50.

MISIC, Z. & ABE, N. (2007) Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology*, 134 (Pt 3), pp. 351-358.

MIŠIĆ, Z. KATIĆ-RADIOJEVIĆ, S. & KULIŠIĆ, Z. (2003) *Cryptosporidium* infections in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the Belgrade district. *Acta Veterinaria-Beograd* 5-6, pp. 361-366.

MOLLOY, S.F. SMITH, H.V. KIRWAN, P. NICHOLS, R.A. ASAOLU, S.O. CONNELLY, L. & HOLLAND, C.V. (2010) Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82 (4), pp. 608-613.

MONIS, P.T. & THOMPSON, R.C. (2003) *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution*, 3 (4), pp. 233-244.

MORGAN, U. WEBER, R. XIAO, L. SULAIMAN, I. THOMPSON, R.C. NDIRITU, W. LAL, A. MOORE, A. & DEPLAZES, P. (2000) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected

- individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (3), pp. 1180-1183.
- MORGAN, U.M. & THOMPSON, R.C. (1998) PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? *Parasitology Today*, 14 (6), pp. 241-245.
- MORGAN, U.M. XIAO, L. FAYER, R. LAL, A.A. & THOMPSON, R.C. (1999) Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology*, 29 (11), pp. 1733-1751.
- MORGAN-RYAN, U.M. FALL, F. WARD, L.A. HIJJAWI, N. SULAIMAN, I. FAYER, R. THOMPSON, R.C. OLSON, M. LAL, A. & XIAO, L. (2002) *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49 (6), pp. 433-440.
- NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E. HAGHIGHI, A. TAGHIPOUR, N. KESHAVARZ, A. MOHEBI, S.R. ZALI, M.R. & XIAO, L. (2011) Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology*, 179, pp. 250-252.
- NEWMAN, R.D. SEARS, CL. MOORE, S.R. NATARO, J.P. WUHIB, T. AGNEW, D.A. GUERRANT, D.A. & LIMA, A.A. (1999) Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, 180 (1), pp. 167-175.
- O'BRIEN, E. MCLNNES, L. & RYAN, U. (2008) *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Experimental Parasitology*, 118 (1), pp. 118-121.
- O'DONOGHUE, P.J. (1995) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25 (2), pp. 139-195.
- O'HARA, S.P. & CHEN, X.M. (2011) The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection*, 13 (8-9), pp. 721-730.
- OKHUYSEN, P.C. & CHAPPELL, C.L. (2002) *Cryptosporidium* virulence determinants-are we there yet? *International Journal for Parasitology*, 32 (5), pp. 517-525.

- OKHUYSEN, P.C. CHAPPELL, C.L. CRABB, J.H. STERLING, C.R. & DUPONT, H.L. (1999) Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 180 (4), pp. 1275-1281.
- OLSON, M.E. O'HANDLEY, R.M. RALSTON, B.J. MCALLISTER, T.A. & THOMPSON, R.C. (2004) Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology*, 20 (4), pp. 185-191.
- OLSON, M.E. THORLAKSON, C.L. DESELLIERS, L. MORCK, D.W. & MCALLISTER, T.A. (1997) *Giardia* and *Cryptosporidium* in canadian farm animals. *Veterinary Parasitology*, 68 (4), pp. 375-381.
- ONDŘÁČKOVÁ, Z. KVÁČ, M. SAK, B. KVĚTOŇOVÁ, D. & ROST, M. (2009) Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 165 (1-2), pp. 141-144.
- PALMER, C.J. XIAO, L. TERASHIMA, A. GUERRA, H. GOTUZZO, E. SALDÍAS, G. BONILLA, J.A. ZHOU, L. LINDQUIST, A. UPTON, S.J. (2003) *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Peru. *Emerging Infectious Disease*, 9 (9), pp. 1174-1176.
- PATEL, S. PEDRAZA-DÍAZ, S. MCLAUCHLIN, J. & CASEMORE, D.P. (1998) Molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspect waterborne outbreaks. Outbreak control team south and West Devon 1995, incident management team and further epidemiological and microbiological studies subgroup North Thames 1997. *Communicable Disease and Public Health*, 1 (4), pp. 231-233.
- PENG, M.M. MESHNICK, S.R. CUNLIFE, N.A. THINDWA, B.D. HART, C.A. BROADHEAD, R.L. & XIAO, L. (2003) Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50 Suppl, pp. 557-559.
- PENG, M.M. XIAO, L. FREEMAN, A.R. AROWOOD, M.J. ESCALANTE, A.A. WELTMAN, A.C. ONG, C.S. MAC KENZIE, W.R. LAL, A.A. & BEARD, C.B. (1997) Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Disease*, 3 (4), pp. 567-573.

- PEREIRA DA FONSECA, I. FAZENDEIRO, I. & ANTUNES, F. (2001) Genetic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from cattle in Portugal: animal and human implications. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48 (Suppl. S1), pp. 32S-33S.
- PIENIAZEK, N.J. BORNAY-LLINARES, F.J. SLEMENDA, S.B. DA SILVA, A.J. MOURA, I.N. ARROWOOD, M.J. DITRICH, O. & ADDISS, D.G. (1999) New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infectious Disease*, 5 (3), pp. 444-449.
- PIPER, M.B. BANKIER, A.T. & DEAR, P.H. (1998) A happy map of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Research*, 8 (12), pp. 1299-1307.
- PLUTZER, J. & KARANIS, P. (2007) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 146 (3-4), pp. 357-362.
- PLUTZER, J. & KARANIS, P. (2009) Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. *Veterinary Parasitology*, 165 (3-4), pp. 187-199.
- PUTIGNANI, L. & MENICHELLA, D. (2010) Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, pp. 1-39.
- QUÍLEZ, J. TORRES, E. CHALMERS, R.M. HADFIELD, S.J. DEL CACHO, E. & SÁNCHEZ-ACEDO, C. (2008) *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (19), pp. 6026-6031.
- QUIROZ, E.S. BERN, C. MACARTHUR, J.R. XIAO, L. FLETCHER, M. ARROWOOD, M.J. SHAY, D.K. LEVY, M.E. GLASS, R.I. & LAL, A. (2000) An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *The Journal of Infectious Diseases*, 181 (2), pp. 695-700.
- RAMIREZ, N.E. WARD, L. & SREEVATSAN, S. (2004) A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6 (8), pp. 773-785.
- ROSALES, M.J. CORDÓN, G.P. MORENO, M.S. & SÁNCHEZ, C.M. (2005) Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica*, 95 (1), pp. 74-78.

- RYAN, U. (2010) *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*, 124 (1), pp. 113–120.
- RYAN, U.M. BATH, C. ROBERTSON, I. READ, C. ELLIOT, A. MCINNES, L. TRAUB, R. & BESIER, B. (2005) Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), pp. 4992-4997.
- RYAN, U.M. MONIS, P. ENEMARK, H.L. SULAIMAN, I. SAMARASINGHE, B. READ, C. BUDDLE, R. ROBERTSON, I. ZHOU, L. THOMPSON, R.C. & XIAO, L. (2004) *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, 90 (4), pp. 769-773.
- RYAN, U.M. SAMARASINGHE, B. READ, C. BUDDLE, J.R. ROBERTSON, I.D. & THOMPSON, R.C. (2003) Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7), pp. 3970-3974.
- SANTÍN, M. TROUT, J.M. & FAYER, R. (2007) Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Veterinary Parasitology*, 146 (1-2), pp. 17-24.
- SANTÍN, M. TROUT, J.M. & FAYER, R. (2008) A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155 (1-2), pp. 15-23.
- SANTÍN, M. TROUT, J.M. XIAO, L. ZHOU, L. GREINER, E. & FAYER, R. (2004) Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122 (2), pp. 103-117.
- SILVERLÅS, C. NÄSLUND, K. BJÖRKMAN, C. & MATTSSON, J.G. (2010) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhea and region. *Veterinary Parasitology*, 169 (3-4), pp. 289-295.
- SLAVIN, D. (1955) *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, 65 (3), pp. 262-266.
- SMITH, H. & NICHOLS, R. (2007) *Cryptosporidium*. In SIMJEE, S. (ed.). *Infectious Disease: Foodborne Diseases*. Totowa: Human Press Inc., pp. 233-276.

- SMITH, H.V. NICHOLS, R.A. & GRIMASON, A.M. (2005) *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21 (3), pp. 133-142.
- SOBA, B. & LOGAR, J. (2008) Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology*, 135 (11), pp. 1263-1270.
- ŠOBA, B. PETROVEC, M. MIOC, V. & LOGAR, J. (2006) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clinical Microbiology and Infection*, 12 (9), pp. 918-921.
- SPANO, F. PUTIGNAMI, L. GUIDA, S. & CRISANTI, A. (1998) *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (Thrombospondin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1). Gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Experimental Parasitology*, 90 (2), pp. 195-198.
- SPANO, F. PUTIGNAMI, L. MCLAUCHLIN, J. CASEMORE, D.P. & CRISANTI, A. (1997) PCR-RFLP of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiology Letters*, 150 (2), pp. 209-217.
- STRONG, W.B. GUT, J. & NELSON, R.G. (2000) Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-Kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-Kilodalton zoite surface antigen products. *Infection and Immunity*, 68 (7), pp. 4117-4134.
- STURDEE, A.P. BODLEY-TICKELL, A.T. ARCHER, A. & CHALMERS, R.M. (2003) Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 116 (2), pp. 92-113.
- SUÁREZ-LUENGAS, L. CLAVEL, A. QUÍLEZ, L. GONI-CECEPERO, M.P. TORRES, E. SÁNCHEZ-ACEDO, C. & DEL CACHO, E. (2007) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, 148 (3-4), pp. 231-235.
- SULAIMAN, I.M. HIRA, P.R. ZHOU, L. AL-ALI, F.M. AL-SHELAHI, F.A. SHWEIKI, H.M. IQBAL, J. KHALID, N. & XIAO, L. (2005) Unique endemicity of

cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (6), pp. 2805-2809.

SULAIMAN, I.M. LAL, A.A. & XIAO, L. (2001) A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Suppl: 24S-27S.

SULAIMAN, I.M. LAL, A.A. & XIAO, L. (2002) Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal of Parasitology*, 88 (2), pp. 388-394.

SULAIMAN, I.M. MORGAN, U.M. THOMPSON, R.C. LAL, A.A. & XIAO, L. (2000) Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-Kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6), pp. 2385-2391.

SULAIMAN, I.M. XIAO, L. YANG, C. ESCALANTE, L. MOORE, A. BEARD, C.B. ARROWOOD, M.J. & LAL, A.A. (1998) Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Disease*, 4 (4), pp. 681-685.

SUNNOTEL, O. LOWERY, C. MOORE, J. DOOLEY, J. XIAO, L. MILLAR, B. ROONEY, P.J. & SNELLING, W.J. (2006) Under the microscope: *Cryptosporidium*. *Letters in Applied Microbiology*, 43, pp. 7–16.

TETLEY, L. BROWN, S.M. MCDONALD, V. & COOMBS, G.H. (1998) Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology*, 144 (Pt 12), pp. 3249-3255.

THOMPSON, R.C. & SMITH, A. (2011) Zoonotic enteric protozoa. *Veterinary Parasitology*, 182 (1), pp. 70-78.

TROTZ-WILLIAMS, L.A. MARTIN, D.S. GATEI, W. CAMA, V. PEREGRINE, A.S. MARTIN, S.W. NYDAM, D.V. JAMIESON, F. & XIAO, L. (2006) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research*, 99 (4), pp. 346-352.

TUMWINE, J.K. KEKITIINWA, A. BAKEERA-KITAKA, S. NDEEZI, G. DOWNING, R. FENG, X. AKIYOSHI, D.E. & TZIPORI, S. (2005) Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without

concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73 (5), pp. 921-925.

TYZZER, E.E. (1907) A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 5 (1), pp. 12-13.

TYZZER, E.E. (1910) An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*, 23 (3), pp. 487-510.3.

TYZZER, E.E. (1912) *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd*, 26, pp. 394-412.

TZIPORI, S. & WARD, H. (2002) Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4 (10), pp. 1047-1058.

UPTON, S.J. & CURRENT, W.L. (1985) The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *Journal of Parasitology*, 71 (5), pp. 625-629.

VESEY, G. ASHBOLT, N. FRICKER, E.J. DEERE, D. WILLIAMS, K.L. VEAL, D.A. & DORSCH, M. (1998) The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Applied Microbiology*, 85 (3), pp. 429-440.

VÍTOVEC, J. HAMADEJOVÁ, K. LANDOVÁ, L. KVÁC, M. KVETONOVÁ, D. & SAK, B. (2006) Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *Journal of Veterinary Medicine*, 53 (5), pp. 239-243.

WALDRON, L.S. & POWER, M.L. (2011) Fluorescence analysis detects gp60 subtype diversity in *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 11 (6), pp. 1388-1395.

WIELINGA, P.R. DE VRIES, A. VAN DER GOOT, T.H. MANK, T. MARS, M.H. KORTBEEK, L.M. & VAN DER GIESSEN, J.W. (2008) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *International Journal for Parasitology*, 38 (7), pp. 809-817.

- XIAO, L. & CAMA, V. (2006) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In ORTEGA, Y. (ed.). *Foodborne Parasites: Food Microbiology and Food Safety*, Griffin, pp. 57-108.
- XIAO, L. & FAYER, R. (2008) Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38 (11), pp. 1239-1255.
- XIAO, L. & FENG, Y. (2008) Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52 (3), pp. 309-323.
- XIAO, L. (2009) Overview of *Cryptosporidium* presentations at the 10th international workshops on opportunistic protists. *Eukaryotic Cell*, 8 (4), pp. 429-436.
- XIAO, L. (2010) Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124 (1), pp. 80-89.
- XIAO, L. ALDERISIO, K. LIMOR, J. ROYER, M. & LAL, A.A. (2000b) Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12), pp. 5492-5498.
- XIAO, L. BERN, C. LIMOR, J. SULAIMAN, I. ROBERTS, J. CHECKLEY, W. CABRERA, L. GILMAN, R.H. & LAL, A.A. (2001a) Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, 183 (3), pp. 492-497.
- XIAO, L. ESCALANTE, L. YANG, C. SULAIMAN, I. ESCALANTE, A.A. MONTALI, R.J. FAYER, R. & LAL, A.A. (1999a) Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (4), pp. 1578-1583.
- XIAO, L. FAYER, R. RYAN, U. & UPTON, S.J. (2004) *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (1), pp. 72-97.
- XIAO, L. MOORE, J.E. UKOH, U. GATEI, W. LOWERY, C.J. MURPHY, T.M. DOOLEY, J.S. MILLAR, B.C. ROONEY, P.J. & RAO, J.R. (2006) Prevalence and

identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (6), pp. 4461-44613.

XIAO, L. MORGAN, U.M. FAYER, R. THOMPSON, R.C. & LAL, A.A. (2000a) *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today*, 16 (7), pp. 287-292.

XIAO, L. MORGAN, U.M. LIMOR, J. ESCALANTE, A. ARROWOOD, M. SHULAW, W. THOMPSON, R.C. FAYER, R. & LAL, A.A. (1999b) Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (8), pp. 3386-3391.

XIAO, L. SINGH, A. LIMOR, J. GRACZYK, T.K. GRADUS, S. & LAL, A. (2001b) Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (3), pp. 1097-1101.

XIAO, L. SULAIMAN, I.M. RYAN, U.M. ZHOU, L. ATWILL, E.R. TISCHLER, M.L. ZHANG, X. FAYER, R. & LAL, A.A. (2002) Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology*, 32 (14), pp. 1773-1785.

XIAO, L. ZHOU, L. SANTÍN, M. YANG, W. & FAYER, R. (2007) Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitology Research*, 100 (4), pp. 701-706.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do actual paradigma taxonómico do género <i>Cryptosporidium</i> .	4
Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de <i>C. parvum</i> .	11
Figura 3. Formas de desenvolvimento de <i>Cryptosporidium</i> spp.	12
Figura 4. Reservatórios e fontes de infecção implicadas na transmissão de <i>Cryptosporidium</i> spp.	17
Figura 5. Fisiopatologia da criptosporidiose	23
Figura 6. Isolado de <i>C. parvum</i> corado por Ziehl-Neelsen modificado	27
Figura 7. Representação esquemática do gene GP60.	36
Figura 8. Distribuição dos níveis de parasitismo em função do hospedeiro	65
Figura 9. Oocistos de <i>C. parvum</i> corados por Ziehl-Neelsen modificado.	66
Figura 10. Gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene SSU rRNA por <i>nested</i> -PCR.	68
Figura 11. Gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene GP60 por <i>nested</i> -PCR.	71
Figura 12. Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene GP60 de todos os isolados de <i>C. parvum</i> na região dos microssatélites.	72
Figura 13. Alinhamento entre a sequência nucleotídica AB560746 e a sequência do isolado caracterizado com o subtipo IIdA21G1a.	74
Figura 14. Alinhamento entre a sequência nucleotídica EU549175 e as sequências dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA22G1	74
Figura 15. Alinhamento entre a sequência nucleotídica EU549712 e as sequências dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA25G1	75
Figura 16. Alinhamento entre a sequência nucleotídica EU549713 e a sequência do isolado caracterizado com o subtipo IIdA26G1	75

Figura 17(A). Alinhamento entre a sequência nucleotídica EU549713 e as sequências dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA27G1 na região dos microsatélites.....	77
Figura 17(B). Alinhamento das sequências nucleotídicas dos isolados caracterizados com o subtipo IIdA27G1	77
Figura 18. Alinhamento da região 3' de todas as sequências nucleotídicas do gene GP60 dos isolados de <i>C. parvum</i> caracterizados neste estudo	78
Figura 19. Relação filogenética entre os subtipos de <i>C. parvum</i> caracterizados neste estudo e outras sequências depositadas no <i>GenBank</i> inferida pela análise de sequência do gene GP60.....	79
Figura 20. Prevalência dos subtipos de <i>C. parvum</i> nas populações humana e animal..	81
Figura 21. Distribuição das famílias de subtipo de <i>C. parvum</i> em função do hospedeiro	82
Figura 22. Distribuição dos subtipos de <i>C. parvum</i> em função do hospedeiro.	82

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I. Características biológicas das espécies do género <i>Cryptosporidium</i> descritas nos humanos	8
Quadro II. Determinantes epidemiológicos dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e sua importância na dinâmica de transmissão	14
Quadro III. Marcadores moleculares utilizados na caracterização de espécimes de <i>Cryptosporidium</i>	31
Quadro IV. Diferenças entre algumas espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> em quatro regiões do gene SSU rRNA	33
Quadro V. Nomenclatura e designação das famílias de subtipo e respectivos subtipos de <i>C. parvum</i> e de <i>C. hominis</i>	35
Quadro VI. Quantificação da carga parasitária nas amostras fecais positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp.....	50
Quadro VII. Sequência dos oligonucleótidos iniciadores utilizadas na amplificação de um fragmento do gene SSU rRNA e tamanho dos fragmentos amplificados	54
Quadro VIII. Condições de amplificação do gene SSU rRNA.....	56
Quadro IX. Sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizadas na amplificação de um fragmento do gene GP60 e tamanho dos fragmentos amplificados	58
Quadro X. Condições de amplificação do gene GP60	59
Quadro XI. Resultados do diagnóstico parasitológico e molecular com os <i>loci</i> SSU rRNA e GP60 nos isolados de origem humana e animal.....	64
Quadro XII. Características das sequências do gene SSU rRNA dos isolados positivos	69
Quadro XIII. Distribuição dos subtipos de <i>C. parvum</i> nas populações humana e animal	80
Quadro XIV. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais das populações humana e animal.....	83

Quadro XV. Subtipos de <i>C. parvum</i> descritos no gado doméstico dos países europeus	107
---	-----

ANEXOS

139

	201		300
RB4	TACCACATCT	AAGGAAGGCA	GCAGGCGCGC
RB9	AAATTACCCA
RH7	ATCCTAATAC
RB24	AGGGAGGTAG
RB16	TGACAAGAAA
RB14	TAACAATACA
RB26	GGACTTTTTC
RB27	GTTCGTGAAT
RB12
RB20
RB17
RB2
RB5
RH2
	301		400
RB4	TGGAATGAGT	TAAGTATAAA	CCCCTTTACA
RB9	AGTATCAATT
RH7	GGAGGGCAAG
RB24	TCTGGTGCCA
RB16	GCAGCCGCGG
RB14	TAATTCCAGC
RB26	TCCAATAGCG
RB27	TATATTAAAG
RB12
RB20
RB17
RB2
RB5
RH2

	401		500
RB4	TTGTTGCAGT TAAAAAGCTC GTAGTTGGAT TTCCTGTTAAT AATTATATATA AAATATTTTG ATGAATATTT ATATAATATT AACATAATTC ATATTACTAT		
RB9
RH7
RB24
RB16
RB14
RB26
RB27
RB12
RB20
RB17
RB2
RB5
RH2
	501		600
RB4	ATATTTTAGT ATATGAAATT TTACTTTGAG AAAATTAGAG TGCTTAAAGC AGGCATATGC CTTGAATACT CCAGCATGGA ATAATATTAA AGATTTTAT		
RB9
RH7
RB24
RB16
RB14
RB26
RB27
RB12
RB20
RB17
RB2
RB5
RH2

142

	801			840
RB4	CTATGCCAAC	TAGAGATTGG	AGGTTGTTCC	TTACTCCTTA
RB9
RH7
RB24
RB16
RB14
RB26
RB27
RB12
RB20
RB17
RB2
RB5
RH2

Os pontos indicam a identidade de sequência das sequências alinhadas obtidas neste estudo. RH: isolado humano; RB: isolado bovino.

Anexo 2: Alinhamento múltiplo dos fragmentos das sequências nucleotídicas dos isolados de *C. parvum* no gene GP60

[illegible]

200


```

201                                     300
RB6  GGAAGTAGGT AATCCAGGTT CTGAAGGTCA GGACGGTAAA GGAGACACTG AAGAAACAGA AGACAATCAG ACCGAGAGTA CTGTTTCTCA A---AATACT
RB4  .....
RB27 .....
RB14 .....
RB8  .....
RB19 .....
RB16 .....
RB22 .....
RB15 .....
RB7  .....
RB26 .....
RH8  .....
RH7  .....
RH1  .....
RB2  .....
RB9  .....
RB24 .....
RH2  .....
RB17 .....
RB12 .....
RP2  .....
RB20 ..-----.. C.GA..C...GTA..C...GTTC.G...AG..AGG.A GT...GAC...T.G.---.A..T---..G...C...C...CCC.C....

```

393

147